

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 1 352 961 A1**

(12)

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**

published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:

15.10.2003 Bulletin 2003/42

(21) Application number: 01272293.0

(22) Date of filing: 21.12.2001

(51) Int Cl.7: **C12N 15/12, C12N 5/10,  
C12N 1/21, C12N 1/15,  
C12N 1/19, C07K 14/47,  
C07K 16/18, C12Q 1/68**

(86) International application number:  
**PCT/JP01/11289**

(87) International publication number:  
**WO 02/052007 (04.07.2002 Gazette 2002/27)**

(84) Designated Contracting States:

**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE TR**

Designated Extension States:

**AL LT LV MK RO SI**

(30) Priority: 22.12.2000 JP 2000405082

27.06.2001 JP 2001266492

(71) Applicant: **Locomogene, Inc.**

**Tokyo 105-0001 (JP)**

(72) Inventors:

- **NAKAJIMA, Toshihiro**  
Yokohama-shi, Kanagawa 224-0001 (JP)
- **AMANO, Tetsuya**  
Kawasaki-shi, Kanagawa 214-0005 (JP)

(74) Representative: **Harding, Charles Thomas**

**D. Young & Co.  
21 New Fetter Lane  
London EC4A 1DA (GB)**

(54) **SYNOVIAL CELL PROTEIN**

(57) The present invention discloses a novel protein called Synoviolin and a gene that encodes it. This protein is expressed specifically by synovial tissue and also accompanies the presence of an auto-antibody that recognizes this protein in rheumatoid arthritis (RA) patients. The protein according to the present invention and its antibody can be expected to be used as specific diagnostic markers for RA. In addition, the gene or protein

according to the present invention may be used to permit the screening of drugs to treat RA. Moreover, the present invention provides synoviolin gene transgenic animals. The transgenic animals according to the present invention can be used as RA model animals in the development of pharmaceuticals to treat RA.

EP 1 352 961 A1

**Description****Technical Field**

5 [0001] The present invention relates to a novel protein pertaining to rheumatoid arthritis (RA), a polynucleotide that encodes this protein and applications for said protein or polynucleotide. More specifically, it relates to a novel protein that can be expected to serve as a specific diagnostic marker for RA. In addition, it also relates to a novel gene that provides new approaches to the development of drugs for the treatment of RA.

**Background Art**

10 [0002] RA is a chronic inflammatory disease of the entire body wherein hyperplasia is seen in the synovial tissue of joints. Synovial cells are fibroblastoid cells that form the one to six epithelioid layers of the synovial membranes of joints, and are thought to supply proteoglycan and hyaluronic acid to the synovial fluid. Hyperplasia of the synovial  
15 tissue is seen in the joints of RA patients along with the resulting symptoms of multilayer structures and infiltration of synovial cells into other tissue caused thereby. In addition, the blood serum of an RA patient contains autoantibodies to the Fc domain of its own IgG. Accordingly, this is thought to be an autoimmune disease, but its cause has yet to be elucidated.

20 [0003] The aforementioned presence of autoantibodies that recognize self-IgG has been long utilized as a characteristic diagnostic indicator of RA. Autoantibody detection kits containing modified human IgG as the main component have recently become commercially available. This autoantibody is also called the RA factor. The diagnosis of RA based on the detection of the RA factor has problems with respect to specificity to the disease and that the relationship to the cause is unclear since the system by which antibodies occur has not been elucidated.

25 [0004] When the pathology of RA is examined from the two aspects of that of the various immune reactions in the body and that of a hyperplastic disease of the joint synovial membrane accompanying bone disruption, much research has been performed regarding the former immune reactions and the molecular mechanism thereof is about to be clarified. However, regarding study of the latter joint synovial cells, even though this is a principal aspect of RA, even their cytobiological characteristics have to be clarified at present. Elucidating the molecular mechanism behind the onset and progress of RA and other chronic and intractable diseases is indispensable for the diagnosis, prevention  
30 and cure of the diseases. Moreover, in the current situation in which the aging of society does not show signs of halting, elucidating the pathology of the aging disease RA is an important problem from a societal standpoint also.

**Disclosure of the Invention**

35 [0005] An objective of the present invention is to provide a novel protein that provides new approaches to the diagnosis and treatment of RA and a novel gene that encodes this protein. The protein provided by the present invention and the polynucleotide that encodes it are closely related to the cause of RA and will provide useful information for diagnosis, and also lead to the creation of new drugs in the development of treatment techniques. Moreover, further objective of the present invention is to provide transgenic animals wherein the genes that encode said proteins are  
40 expressed, along with knockout animals that lack said gene. These animals will be useful in analyzing the functions of the gene according to the present invention and also in the development of RA treatment methods and treatment drugs as model animals.

45 [0006] The present inventors used anti-human synovial cell antibodies obtained using cultured human synovial cells from RA patients as the immunogen to perform immunoscreening of a cDNA library of synovial cells of RA patients, and thus succeeded in isolating a new gene expressed in the synovial tissue of RA patients. The protein encoded by this gene was named Synoviolin after the synovial cells which are the tissues in which this gene is expressed.

50 [0007] The present inventors have confirmed that the reactivity of anti-human synovial cell antibodies to about 80-kDa, 140-kDa, and 220-kDa molecular weight fractions of the aforementioned cultured synovial membrane cells is absorbed by the expression products of the aforementioned synoviolin gene. In addition, the present inventors found that these bands and the expression products of the aforementioned synoviolin gene exhibit reactivity to antibodies present in the blood of RA patients. Moreover, the inventors confirmed that anti-human synovial cell antibodies exhibit strong reactivity to the synovial tissue of RA patients.

55 [0008] In addition, the present inventors used biochemical linkage experiments to demonstrate the presence of the Synoviolin ligand (SL), which is a natural ligand of Synoviolin. SL is a protein that the present inventors for the first time isolated as a ligand of Synoviolin. However, when an attempt was made to perform a search based on nucleotide sequences for the DNA that encodes SL, a known gene called S1-5 was found to include a common nucleotide sequence in the 5' terminal domain and 3' terminal domain. The SL isolated by the present inventors and S1-5 are nearly identical not only in the DNA partial sequence but also the size of the gene, the molecular weight of the expression

product and other aspects, and thus there is a good probability that they are the same protein. S1-5 [also called "FBNL" (fibrillin-like) or "EFEMP1" (EGF-containing fibrillin-like extracellular matrix protein 1)] has been isolated as a gene that is overexpressed in a human diploid fibroblast (Lecka-Czernik, B. et al., Molecular and Cellular Biology, 15, 120-128, 1995). Structurally, it has an epidermal growth factor (EGF)-like domain that promotes DNA synthesis. The structure and nucleic acid synthesis promotion activity (hyperplastic activity) of S1-5 have been found. In addition, mutations of S1-5 have recently been reported to be associated with Malattia Leventinese (ML) and Doyme honeycomb retinal dystrophy (DHRD) (Stone, E. M. et al., Nature Genetics 22, 199-202, 1999), but no association with RA was known. In addition, it is needless to say that the affinity with Synoviolin is completely new knowledge acquired by the present inventors.

[0009] Moreover, the present inventors have prepared a transgenic mouse by introducing the synoviolin gene and a knockout mouse that lacks the synoviolin gene and observed their phenotypes. When the Synoviolin molecule is excessively expressed in the mouse, hyperplasia of synovial membranes in joints and bone and cartilage disruption were found, thus exhibiting symptoms resembling those of rheumatoid arthritis. On the other hand, when the synoviolin gene was completely (homozygously) knocked out, incomplete limb bud and skeletal formation were found in the mouse during the fetal stage. These phenotypes suggest the contribution of Synoviolin not only to synovial tissue but also to the generation, differentiation, regeneration and metabolism of cartilage and bone tissue. In addition, in the arthropathic lesions of Synoviolin overexpression mice, metabolism and regeneration are actively induced in the synovial membrane, cartilage and bone tissue. These results clearly demonstrate that the Synoviolin molecule contributes to RA and other forms of arthropathy. Moreover, it has been confirmed that Synoviolin overexpression mice are useful as arthropathic model animals.

[0010] Based on this new knowledge, the present inventors have clarified the utility of Synoviolin and its gene, its antibodies or ligands in medical treatment or diagnosis, thereby completing the present invention. Moreover, the present inventors prepared a transgenic animal by introducing the synoviolin gene, and have demonstrated its utility as a disease model for RA. In addition, the present inventors prepared a knock-in animal by substituting the lacZ gene for the synoviolin gene. The synoviolin gene knock-out and lacZ gene knock-in animal makes it possible to analyze the effects of the lack of the synoviolin gene and also allows the activity of the synoviolin gene promoter to be easily detected by the detection of LacZ (as  $\beta$ -galactosidase activity) expressed by an endogenous promoter of the synoviolin gene. Using this knock-in animal, it is possible to perform screening for compounds that regulate the expression of the synoviolin gene. It is thought that it should be also possible to prevent hyperplasia of synovial membranes and to remit the disease by suppressing the overexpression of the synoviolin gene in the joints of rheumatism patients.

[0011] The gene discovered by the present inventors is closely related to the hyperplasia of synovial tissue, which is the main component of the disease of RA, and provides extremely important information for diagnosis. In addition, in contributing to the hyperplasia of synovial tissue, which is the cause of RA, the present invention's gene, its expression product, autoantibodies to the expression product, and also ligands of the expression product are thought to be material that is indispensable in the explanation of the pathology of RA. In particular, the discovery of autoantibodies that recognize Synoviolin in the blood of RA patients gives a completely new approach in the diagnosis of RA. In addition, these substances will lead to brand-new approaches in the development of RA treatment methods also.

[0012] In addition, the mutations of S1-5 identified as Synoviolin ligands are associated with ML and DHRD, and thus it is possible that Synoviolin contributes to these diseases also. Accordingly, Synoviolin may be used in the diagnosis of these diseases, while compounds that regulate the binding of Synoviolin ligands to Synoviolin or compounds that act as ligands of Synoviolin or the like become candidates as medicines for these diseases.

[0013] In addition, Synoviolin is expressed in undifferentiated mesenchymal cells during development. Accordingly, it is possible to use Synoviolin as a cell marker to isolate undifferentiated mesenchymal cells in a cell sorter or the like. The undifferentiated mesenchymal cells thus isolated can be utilized for *in vitro* tissue regeneration. If the *in vitro* reconstruction of joints is possible, then this would be useful for the reconstructive medical treatment of not only rheumatoid arthritis patients but also many patients suffering from joint damage.

[0014] To wit, the present invention relates to the following Synoviolin protein, an antibody thereof, a polynucleotide that encodes this protein, applications thereof, Synoviolin ligands and their applications, along with transgenic animals wherein the expression of the synoviolin gene is modified and applications thereof.

[1] A polynucleotide selected from the group consisting of (a) through (e) below:

- (a) a polynucleotide that encodes a protein comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2,
- (b) a polynucleotide comprising a protein coding domain of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1,
- (c) a polynucleotide encoding a protein that comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 in which one or more amino acids are substituted, deleted, inserted and/or added and that is functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2,
- (d) a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide consisting of the nucleotide

sequence shown in SEQ ID NO: 1 and that encodes a protein functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, and

(e) a polynucleotide that comprises a nucleotide sequence having at least 70% or greater identity to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 and that encodes a protein functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

[2] A polynucleotide that encodes a partial peptide of a protein consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

[3] A protein or peptide encoded by the polynucleotide according to [1] or [2].

[4] The protein or peptide according to [3] that has at least one activity selected from the group consisting of the following (1) through (3):

(1) binds to antibodies found in the blood of rheumatoid arthritis patients,

(2) binds to the Synoviolin ligand S1-5, and

(3) promotes synovial membrane hyperplasia.

[5] A vector into which the polynucleotide according to [1] or [2] is inserted.

[6] A transformed cell that carries the polynucleotide according to [1] or the vector according to [5].

[7] A method of manufacturing the protein or peptide according to [3], said method comprising the steps of culturing the transformed cell according to [6] and recovering the expressed protein or peptide from said transformed cell or the culture supernatant.

[8] An antibody that binds to the protein or peptide according to [3].

[9] An immunological analysis reagent for analyzing antibodies that recognize the protein or peptide according to [3], said reagent comprising the protein or peptide according to [3].

[10] The immunological analysis reagent according to [9], wherein the reagent is used to diagnose rheumatoid arthritis or to judge effectiveness of treating it.

[11] An immunological analysis reagent for analyzing the protein according to [3], said reagent comprising an antibody that reacts with the protein or peptide according to [3].

[12] The immunological analysis reagent according to [11], wherein the reagent is used to diagnose rheumatoid arthritis or to judge effectiveness of treating it.

[13] The immunological analysis reagent according to [12], wherein the protein according to [3] is present in synovial cells.

[14] A method of measuring antibodies in a biological specimen, wherein said antibodies bind to the protein according to [3] and/or a partial peptide thereof, said method comprising the following steps of:

(1) contacting the biological specimen with the protein according to [3] and/or a partial peptide thereof, and

(2) detecting the antibodies that bind to the protein according to [3] and/or a partial peptide thereof.

[15] A method of measuring the protein according to [3] and/or a partial peptide thereof in a biological specimen, said method comprising the following steps of:

(1) contacting the biological specimen with the antibody according to [8], and

(2) detecting the antibody according to [8], wherein said antibody binds to the protein according to [3] and/or a partial peptide thereof.

[16] A polynucleotide that comprises at least 15 nucleotides and that is complementary to a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or to a complementary strand thereof.

[17] A method of measuring the polynucleotide according to [1] or [2] in a biological specimen, said method comprising the following steps of:

(1) contacting the biological specimen with the polynucleotide according to [16], and

(2) detecting the polynucleotide according to [16], wherein said polynucleotide hybridizes with the polynucleotide according to [1] or [2].

[18] A kit for measuring the polynucleotide according to [1] or [2], said kit comprising the polynucleotide according to [16].

[19] A method of detecting or isolating cells that express the protein according to [3], said method comprising the step of using, as an index, said protein or the expression of a gene that encodes said protein.



[20] The method according to [19], wherein said cells are rheumatoid synovial cells.

[21] The method according to [19], wherein said cells are undifferentiated mesenchymal cells.

[22] A reagent for the detection or isolation of cells that express the protein according to [3], said reagent comprising the antibody according to [8].

[23] A method of detecting rheumatoid arthritis, wherein the marker for rheumatoid arthritis is at least one selected from the group consisting of the polynucleotide according to [1], the protein according to [3], the peptide according to [3], antibodies that bind to the protein according to [3], and antibodies that bind to the peptide according to [3], the method comprising the following steps of:

- i) detecting the markers for rheumatoid arthritis present in a biological specimen from a subject, and
- ii) associating the results of detection of step i) with rheumatoid arthritis.

[24] The method according to [23], wherein the biological specimen is blood from a subject and the marker for rheumatoid arthritis comprises antibodies that bind to the protein according to [3] and/or antibodies that bind to the peptide according to [3].

[25] The method according to [23], wherein the biological specimen comprises synovial tissue or synovial cells from a subject and the marker for rheumatoid arthritis comprises the polynucleotide according to [1] and/or the protein according to [3].

[26] A method of detecting the binding activity of a test compound to the protein or peptide according to [3], said method comprising the following steps of:

- a) contacting the test compound with the protein or peptide according to [3], and
- b) observing the binding of the test compound to said protein or peptide.

[27] A method of screening compounds that have the activity of binding to the protein or peptide according to [3], said method comprising the following steps of:

- a) detecting the binding activity of test compounds to the protein or peptide according to [3] by the method according to [26], and
- b) selecting the test compounds the binding activity of which is higher than a control.

[28] A method of detecting the activity of blocking the binding of the protein according to [3] to its ligand, said method comprising the following steps of:

- a) contacting the protein or peptide according to [3] with its ligand in the presence of a test compound, and
- b) detecting the ligand and/or test compound that bind to said protein or peptide.

[29] The method according to [28], wherein the ligand is the Synoviolin ligand S1-5.

[30] A method of screening compounds that have the activity of blocking the binding of the protein according to [3] to its ligand, said method comprising the following steps of:

- a) detecting the activity of test compounds to block the binding of the protein according to [3] to its ligand by the method according to [28], and
- b) selecting the test compounds said blocking activity of which is higher than a control.

[31] A method of detecting the activity of a test compound to regulate signal transduction via the protein according to [3], said method comprising the following steps of:

- a) contacting the test compound with said protein either in the presence of, or in the absence of, the ligand of said protein, and
- b) detecting signal transduction via said protein.

[32] A method of screening compounds that have the activity of regulating signal transduction via the protein according to [3], said method comprising the following steps of:

- a) detecting the activity of test compounds to regulate signal transduction via the protein by the method according to [31], and
- b) selecting the test compounds said regulation activity of which is higher than a control.

[33] A method of detecting the activity of regulating the expression of the polynucleotide according to [1], said method comprising the following steps of:

- a) culturing cells that express the polynucleotide according to [1] in the presence of a test compound, and
- b) measuring the expression level of said polynucleotide.

[34] A method of screening compounds that regulate the expression of the polynucleotide according to [1], said method comprising the following steps of:

- a) detecting the activity of test compounds to regulate the expression of the polynucleotide according to [1] by the method according to [33], and
- b) selecting the test compounds that have a difference in said activity in comparison to a control.

[35] An agent that stimulates Synoviolin, said agent comprising as an active ingredient a compound that is obtainable by the screening method according to [27].

[36] An agent that blocks the binding between Synoviolin and Synoviolin ligand, said agent comprising as an active ingredient a compound that is obtainable by the screening method according to [30].

[37] An agent that blocks synovial hyperplasia, said agent comprising as an active ingredient a compound that is obtainable by the screening method according to [30] or [32].

[38] A pharmaceutical composition that comprises as an active ingredient a component selected from the group consisting of the polynucleotide according to [1] or [2], the protein or peptide according to [3], and the vector according to [5].

[39] A transgenic non-human vertebrate in which the expression of the polynucleotide according to [1] or [2] is modified or said modification is inducible.

[40] The transgenic non-human vertebrate according to [39], wherein the polynucleotide according to [1] or [2] is exogenously transformed.

[41] The transgenic non-human vertebrate according to [40], wherein said vertebrate is a rheumatoid arthritis model animal.

[42] A transgenic non-human vertebrate in which the expression of the endogenous polynucleotide according to [1] or [2] is suppressed.

[43] The transgenic non-human vertebrate according to [42], wherein another gene is knocked in.

[44] A cell derived from the transgenic non-human vertebrate according to [40] or [42].

[45] A method of detecting the activity of regulating the activity of an endogenous promoter of the polynucleotide according to [1] or [2], said method comprising the following steps of:

- a) contacting a test compound with an expression system that expresses a reporter gene under the control of the endogenous promoter of the polynucleotide according to [1] or [2], and
- b) measuring the expression level of the reporter gene.

[46] The method according to [45], wherein said expression system is the transgenic non-human vertebrate according to [43] or cells derived from the vertebrate.

[47] A method of screening compounds that regulate the activity of the endogenous promoter of the polynucleotide according to [1] or [2], said method comprising the following steps of:

- a) measuring the activity of test compounds to regulate the activity of the endogenous promoter of the polynucleotide according to [1] or [2] by the method according to [45], and
- b) selecting the test compounds that have a difference in said activity in comparison to a control.

[48] A pharmaceutical composition for regulating the expression of the polynucleotide according to [1], said pharmaceutical composition comprising as an active ingredient a compound that is obtainable by the screening method according to [34] or [47].

[0015] In addition, the present invention relates to a method of stimulating Synoviolin comprising a step of administering a compound that is obtainable by the screening method according to [27]. Alternatively, the present invention relates to a method of blocking the binding of Synoviolin to Synoviolin ligand comprising a step of administering a compound that is obtainable by the screening method according to [30]. Furthermore, the present invention relates to a method of blocking synovial hyperplasia comprising a step of administering a compound that is obtainable by the screening method according to [30] or [32]. In addition, the present invention relates to a method of promoting synovial

hyperplasia comprising a step of administering a component selected from the group consisting of the polynucleotide according to [1] or [2], the protein or peptide according to [3], and the vector according to [5]. Moreover, the present invention relates to a method of regulating the expression of the polynucleotide according to [1] comprising a step of administering a compound that is obtainable by the screening method according to [34] or [47].

**[0016]** In addition, the present invention relates to use of a compound that is obtainable by the screening method according to [27] for the manufacture of an agent that stimulates Synoviolin. Alternatively, the present invention relates to use of a compound that is obtainable by the screening method according to [30] for the manufacture of an agent that blocks the binding between Synoviolin and Synoviolin ligand. Moreover, the present invention relates to use of a compound that is obtainable by the screening method according to [30] or [32] for the manufacture of an agent that blocks synovial hyperplasia. In addition, the present invention relates to use of a component selected from the group consisting of the polynucleotide according to [1] or [2], the protein or peptide according to [3], and the vector according to [5] for the manufacture of an agent that promotes synovial hyperplasia. Moreover, the present invention relates to use of a compound that is obtainable by the screening method according to [34] or [47] for the manufacture of a pharmaceutical composition for regulating the expression of the polynucleotide according to [1].

**[0017]** The present invention provides a polynucleotide that encodes Synoviolin containing a protein coding domain of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1. The polynucleotide in the present invention may be either DNA or RNA. In addition, it may also include a modified nucleotide. The polynucleotide that encodes the Synoviolin according to the present invention can be cloned from said synovial cells from a RA patient by known methods (Nucleic Acid Res. 16: 7583-7600, 1988). Specifically, a cDNA library is obtained based on mRNA extracted from synovial cells derived from tissue in which the onset of arthritis has occurred, where the tissue is recovered from an RA patient as synovial tissue or cultured cells (Nucleic Acid Research 16: 7583, 1988). A probe designed based on the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 can be used to isolate, from this library, the synoviolin gene by the screening of clones to which the probe hybridizes.

**[0018]** The present invention also encompasses any polynucleotide that encodes a protein that is functionally equivalent to the aforementioned Synoviolin. In the present invention, a polynucleotide that encodes a protein that is functionally equivalent to the Synoviolin is referred to as a polynucleotide functionally equivalent to Synoviolin. First, a functionally equivalent protein is defined as a protein that is immunologically equivalent to Synoviolin. To wit, in the present invention, a protein functionally equivalent to Synoviolin can be a domain of Synoviolin as long as it reacts with antibodies that specifically recognize Synoviolin and are present in the blood serum of an RA patient. Alternatively, it can also be a fragment of a protein that contains this immunologically active domain. Mutants thereof can be easily selected by a person skilled in the art by screening for fragments of Synoviolin using an RA patient blood serum panel and the blood serum of non-afflicted controls.

**[0019]** A protein functionally equivalent to the Synoviolin according to the present invention is defined not only based on immunological characteristics but also based on the characteristic of binding to SL (S1-5). To wit, the present invention encompasses fragments of Synoviolin that have affinity to SL (S1-5). Mutants thereof can be easily selected by a person skilled in the art by screening for candidate proteins using SL (S1-5). For example, as shown in Examples, the SL (S1-5) discovered by the present inventors demands, for the binding to Synoviolin, 120 amino acid residues corresponding to numbers 1233-1592 in the cDNA of Synoviolin. Accordingly, the protein consisting of the amino acid sequence that constitutes this domain, or the protein including this amino acid sequence constitutes a protein functionally equivalent to the Synoviolin according to the present invention. A protein that can be used as SL may be the S1-5 protein identified by accession number AAA65590 (nucleotide accession U03877), I38449, NP\_061489 (nucleotide accession NM\_018894), NP\_004096 (nucleotide accession NM\_004105), or Q12805, or a similar protein that binds to the human Synoviolin protein (SEQ ID NO: 2) (Lecka-Czernik, B. et al., Mol. Cell. Biol. 15, 120-128, 1995; Heon, E. et al., Arch. Ophthalmol. 114, 193-198, 1996; Ikegawa, S. et al., Genomics 35, 590-592, 1996; Katsanis, N. et al., Hum. Genet. 106, 66-72, 2000; Giltay, R. et al., Matrix Biol. 18, 469-480, 1999; Stone, E. M. et al., Nat. Genet. 22, 199-202, 1999).

**[0020]** In addition, examples of proteins functionally equivalent to human Synoviolin include proteins that have the activity of promoting synovial hyperplasia. Transgenic mice into which the human synoviolin gene was overexpressed were found to exhibit the swelling of toes that accompanies arthritis with a significant frequency. Histologically, bone disruption with synovial hyperplasia and abnormal osteogenesis were observed in their toe joints. A protein functionally equivalent to the human Synoviolin protein may also be defined based on the activity of promoting synovial hyperplasia. The promotion of synovial hyperplasia can be verified by the creation of transgenic animals, or also by the local introduction of genes into joints, or by the expression of proteins in *in vitro* cultured synovial cells. The method of obtaining transgenic animals using the polynucleotide according to the present invention is described later.

**[0021]** Examples of proteins that are functionally equivalent to human Synoviolin include proteins that have activity contributing to the formation of normal bones and the development of limbs. In development, Synoviolin was expressed strongly in the parietal bone, limbs, ears and other regions where bone and cartilage are formed, and in the limb formation stage, strong expression was observed in the apical ectodermal ridge (AER) and the anlage of cartilage and

bone. Knock-out mouse embryos that have the endogenous synoviolin gene knocked out by targeting have a short length from the parietal region to the buttocks, and a trend for the formation of the skull and limbs to be premature was found. The homozygote exhibited abnormal formation in limb buds, the upper and lower jawbones and ears, leading to fetal death with a high probability. The synoviolin gene homozygous knock-out mouse exhibited abnormalities in the formation of limb buds in the fetal stage; formation of cartilage and bone was not found; and the expression of Synoviolin was found in the limb buds and regions of generation of cartilage and bone, thus demonstrating that the Synoviolin molecule contributes to skeletal formation and the development of limbs.

[0022] In an analysis using a culture system based on the explant method, the expression of LacZ in cells derived from the limb buds of a synoviolin knock-out (lacZ gene knock-in) mouse embryo was found only in undifferentiated mesenchymal cells that are thought to be the anlage of cartilage, bone and limbs. Moreover, by the alkaline phosphatase stain, von Kossa stain or other methods, it was confirmed that the capacity to form bone and cartilage was delayed in homozygous knockout mouse-derived cells. The contribution to normal bone formation and limb development is thought to be verifiable by the creation of knock-out animals, and also, by using analysis of the expression of marker genes of bone and cartilaginous cells in *in vitro* culture and analysis of the capacity of bone formation. In addition, the fact that a certain protein has activity contributing to normal bone formation and limb development can also be confirmed in a knock-out animal or cultured cells in which the expression of the polynucleotide according to the present invention has been suppressed, by administering a protein encoded by said polynucleotide, or by the fact that the lost functions are restored by the expression of DNA or RNA that encodes said protein.

[0023] In addition, the protein functionally equivalent to the Synoviolin according to the present invention may also be defined based on the biochemical activity of Synoviolin. The biochemical activity of Synoviolin can be defined as tyrosine kinase or ubiquitin ligase activity, for example. These biochemical activities are corroborated by various motifs discovered in Synoviolin and the results of Examples. To wit, the present invention encompasses fragments of Synoviolin that maintain at least one biochemical activity that Synoviolin has. The method of confirming the biochemical activity of Synoviolin and the domains where the respective biochemical activities are kept are specifically described later.

[0024] These proteins that are functionally equivalent to Synoviolin can be combined with other proteins to form fusion proteins. For example, a protein to which a FLAG tag, HA tag, histidine tag or other additional amino acid sequence is added but which maintains at least one of the properties of the aforementioned proteins that are functionally equivalent to Synoviolin is also included in said functionally equivalent proteins. Even in the event that the added protein has activities different from those of Synoviolin, that fusion protein is included in the functionally equivalent proteins according to the present invention, as long as it keeps at least one of the functions of Synoviolin.

[0025] Polynucleotides comprising nucleotide sequences that contain mutations in the aforementioned polynucleotide according to the present invention may also be isolated by persons skilled in the art using known methods (*Jikken Igaku Bessatsu Idenshi Kogaku Handobukku* [Experimental Medicine, Supplement - Genetic Engineering Handbook], pp. 246-251, Yodosha Co., Ltd., 1991). For example, if screening is performed on a library containing similar genes using the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 (or a fragment thereof) as a probe, then it is possible to clone DNA having a nucleotide sequence with a high degree of homology. As such a library, it is possible to use one that includes random mutations in the nucleotide sequences of SEQ ID NO: 1, a cDNA library of synovial tissue derived from non-human species, etc.

[0026] Examples of known methods of randomly adding mutations to a given nucleotide sequence include the substitution of base pairs by the nitrous acid treatment of DNA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:7258-7260, 1982). With this method, it is possible to introduce the random substitution of base pairs within a specific segment by treating the segment in which mutations are to be introduced with nitrous acid. As techniques for inducing intended mutations at arbitrary locations, there are also the gapped duplex and other methods (Methods in Enzymol., 154:350-367, 1987). A circular double-stranded vector into which the gene to be mutated has been cloned is made into a single strand and hybridized with a synthetic oligonucleotide that has a mutation at the target location. Complementary single-stranded DNA derived from a linearized vector cut by restriction enzymes is annealed to the aforementioned circular single-stranded vector. The gap between the aforementioned synthetic nucleotide and the complementary single-stranded DNA is filled with DNA polymerase and ligation is performed to form a complete double-stranded circular vector.

[0027] The number of modified amino acids is thought to be typically 50 amino acids or less, preferably 30 amino acids or less, and even more preferably 5 amino acids or less (e.g. 1 amino acid).

[0028] When amino acids are artificially substituted, if they are substituted for amino acids with similar properties, the original activity of the protein is thought to be more easily maintained. The proteins according to the present invention include proteins to which conservative substitutions are added in the aforementioned amino acid substitution, and functionally equivalent to the human Synoviolin protein (SEQ ID NO: 2). Conservative substitutions are thought to be important in the case of substituting the amino acids in domains that are important to the activity of the protein, etc. Such conservative substitutions of amino acids are well known to persons skilled in the art.

[0029] Examples of amino acid groups for conservative substitution include basic amino acids (e.g., lysine, arginine,

and histidine), acidic amino acids (e.g., aspartic acid and glutamic acid), uncharged polar amino acids (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, and cysteine), nonpolar amino acids (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, and tryptophan),  $\beta$ -branched amino acids (e.g., threonine, valine, and isoleucine), aromatic amino acids (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, and histidine) and others.

**[0030]** In addition, non-conservative substitution is thought to increase the activity or the like of the protein (e.g., including constitutively active proteins and the like) or decrease same (e.g., including dominant negatives and the like).

**[0031]** A protein that has the amino acid sequence according to SEQ ID NO: 2 in which one or more amino acids are substituted, deleted, inserted and/or added, and that is functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, also includes a natural protein. The genes of eukaryotes typically have polymorphism as seen in the interferon gene and the like. Changes in the nucleotide sequence arising due to this polymorphism may include cases where one or more amino acids are substituted, deleted, inserted and/or added. The present invention also encompasses a protein that is naturally present and that is a protein that has the amino acid sequence according to SEQ ID NO: 2 in which one or more amino acids are substituted, deleted, inserted and/or added, and that is functionally equivalent to the protein consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

**[0032]** In fact, the present inventors have cloned the gene according to the present invention from a plurality of individuals and, by determining its nucleotide sequence, confirmed a clone from which one amino acid is deleted. The present invention encompasses a protein that includes such mutations in the amino sequence, and a polynucleotide comprising a nucleotide sequence that encodes it. The nucleotide sequence of the clone missing one amino acid confirmed by the present inventors is shown in SEQ ID NO: 6, and the amino acid sequence encoded by this nucleotide sequence is shown in SEQ ID NO: 7. The nucleotide sequence of SEQ ID NO: 6 lacks the gca corresponding to 1293-1295 in SEQ ID NO: 1. As a result, the amino acid sequence according to SEQ ID NO: 7 lacks the Ala in position 412 of SEQ ID NO: 2.

**[0033]** Alternatively, in some cases, even if there is a change in the nucleotide sequence due to polymorphism, the amino acid sequence may not change. Such mutations in the nucleotide sequence are called silent mutations. The present invention also encompasses genes comprising a nucleotide sequence that has silent mutations. Polymorphism as referred to herein means that a certain gene has different nucleotide sequences among individuals within a group. Polymorphism is unrelated to the ratios in which different genes are found.

**[0034]** In addition, methods by which a protein functionally equivalent to Synoviolin is obtained may include a method that utilizes hybridization, for example. To wit, this is a method wherein a polynucleotide or fragment thereof that encodes the Synoviolin according to the present invention as shown in SEQ ID NO: 1 is used as a probe and a polynucleotide that can be hybridized therewith is isolated. If hybridization is performed under stringent conditions, then a polynucleotide with high homology as the nucleotide sequence is selected, and consequently, the probability of a protein functionally equivalent to Synoviolin being contained in the protein to be isolated becomes higher. A nucleotide sequence with high homology is defined to be one that is 70% identical or greater, or preferably 90% identical or greater, for example.

**[0035]** Examples of the stringent conditions include conditions of, for example, hybridization at 6 $\times$ SSC, 40% formamide and 25°C, and washing at 1 $\times$ SSC and 55°C. While stringency is affected by the conditions such as salt concentration, formamide concentration or temperature, it is clear that a person skilled in the art may set these conditions so that the required stringency is obtained.

**[0036]** By using hybridization, it is possible to isolate a polynucleotide that encodes a homologue of Synoviolin in non-human animal species, for example. A homologue of Synoviolin encoded by a polynucleotide that can be obtained from a mouse, rat, rabbit, pig, goat or other non-human animal species constitutes a functionally equivalent protein in the present invention.

**[0037]** There are no limitations on the source of the polynucleotide of the present invention. To wit, it may be obtained from cDNA, genome DNA or synthesis. In addition, it may include a polynucleotide that has an arbitrary nucleotide sequence based on the degeneracy of genetic code, as long as it can encode the protein according to the present invention.

**[0038]** A protein obtained by introducing mutations into human Synoviolin (SEQ ID NO: 2) and a protein encoded by a polynucleotide isolated using the aforementioned hybridization technique and the like normally have high homology to human Synoviolin (SEQ ID NO: 2) in the amino acid sequence. High homology means that the sequence is 30% identical or greater, preferably 50% identical or greater, or more preferably 80% identical or greater (e.g., 95% or greater). The identity of nucleotide and amino acid sequences can be determined using a homology search site on the Internet [e.g., at the DNA Data Bank of Japan (DDBJ), the FASTA, BLAST, PSI-BLAST, SSEARCH or other homology searches can be used [e.g., the DNA Data Bank of Japan (DDBJ) web site's homology search (Search and Analysis) page: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>] and at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), a search using BLAST can be performed (e.g., the NCBI home page web site's BLAST page: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol., 1990, 215(3):403-10; Altschul, S.F. & Gish, W., Meth. Enzymol., 1996, 266:460-480; Altschul, S.F. et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402)].

[0039] For example, calculation of the identity of the amino acid sequence can be performed in Advanced BLAST 2.1 by using blastp as the program, setting the Expect value to 10, setting all Filters to OFF, using BLOSUM62 as the Matrix, setting the Gap existence cost, Per residue gap cost and Lambda ratio to 11, 1 and 0.85, respectively, (default values) and performing a search. The value (%) of the identity can then be obtained (Karlin, S. and S. F. Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68; Karlin, S. and S. F. Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7).

[0040] The present invention provides applications of these polynucleotides besides the production of proteins. To wit, the present invention encompasses anti-sense polynucleotides against polynucleotides and portions thereof that encode Synoviolin provided by the present invention. The anti-sense polynucleotide preferably has a chain length of roughly 15-20 nucleotides in order to block the transcription of genes effectively. If Synoviolin supports the abnormal hyperplasia of synovial cells, then Synoviolin anti-sense polynucleotide has a major role in the treatment of RA. From the standpoint of the control of gene expression, it is also possible to design not only anti-sense polynucleotide but a ribozyme also. To wit, it is possible to design a ribozyme that recognizes and cuts RNA transcribed from the coding region of DNA shown in SEQ ID NO: 1.

[0041] The present invention also relates to polynucleotides with a chain length of at least 15 nucleotides which are complementary to the polynucleotide according to the present invention or a complementary strand thereof. These polynucleotides are those with a chain length of preferably 20 nucleotides or more, more preferably 25 nucleotides or more, or even more preferably 30 nucleotides or more which are complementary to the polynucleotide according to the present invention or a complementary strand thereof. Herein, a "complementary strand" indicates the other strand corresponding to one strand of a double-stranded nucleic acid consisting of the base pairs A:T (or U in the case of RNA) and G:C. In addition, "complementary" is defined not to be limited to the case where there is a completely complementary sequence in a domain of at least 15 consecutive nucleotides, but also includes nucleotide sequences that have homology in the nucleotide sequence of at least 70%, preferably at least 80%, more preferably 90% and even more preferably 95% or greater. The algorithm used for determining homology may be one recited herein. These include, for example, polynucleotides that hybridize with the aforementioned polynucleotides according to the present invention and that have a chain length of at least 15 nucleotides.

[0042] Hybridization is preferably specific to the polynucleotides according to the present invention. Herein, the term "specific" means that, under stringent hybridization conditions, significant cross-hybridization does not occur with polynucleotides that encode other proteins.

[0043] These polynucleotides are useful as probes and primers that permit the detection and amplification of synoviolin genes. It is preferable that the probes and primers according to the present invention have a chain length of at least roughly 15mer and have a nucleotide sequence that can hybridize to a sequence specific to synoviolin within the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 so that specific hybridization will be possible under a given stringency. It is obvious for a person skilled in the art to design a useful nucleotide sequence for the probe or primer based on a given nucleotide sequence. Using the synoviolin gene-specific probes or primers provided based on the present invention, *in situ* hybridization and PCR of synovial cell sample become possible. Because Synoviolin is overexpressed in the synovial tissues of RA patients, an understanding of the state of expression in the cells is thought to give important information for understanding RA arthritic symptoms.

[0044] Synoviolin, which is the novel protein according to the present invention, can be obtained from the synovial tissue of RA patients. Because synovial cells can be cultured *in vitro*, it is possible to recover Synoviolin from this culture. Specifically, synovial cells are isolated from synovial tissue or the like surgically removed from RA patients in a synovectomy. By culturing the isolated cells, it is possible to recover synovial cells as adhesive cells (J. Clin. Invest. 92: 186-193, 1993). Synoviolin is extracted and purified from the recovered cells by a combination of known protein purification techniques.

[0045] The present invention encompasses not only human Synoviolin extracted from synovial cells but also proteins that are functionally equivalent to Synoviolin. To wit, the protein according to the present invention may be produced either artificially or naturally, and encompasses a mutant protein that has the amino acid sequence of human Synoviolin (SEQ ID NO: 2) in which one or more amino acids are substituted, deleted, inserted and/or added and that is functionally equivalent to human Synoviolin. There is no limitation on the number or locations of amino acid mutations in these proteins as long as the functions of Synoviolin are preserved.

[0046] Fragments of Synoviolin can be obtained by digestion using protease. In addition, they can also be obtained by randomly cutting the DNA that encodes the Synoviolin shown in SEQ ID NO: 1, and inserting them into phage vectors to create a phage library that presents domain peptides. If this library is subjected to immunoscreening with antibodies that recognize Synoviolin, it is possible to determine the immunologically active domain. The technique for determining the immunologically active domain can also be used without modification as a technique for determining the domain of binding activity with the ligand. Regarding the cloned phages, if the nucleotide sequence of the inserted fragment is determined, then the amino acid sequence of the active domain can also be clarified.

[0047] The protein according to the present invention or a protein functionally equivalent thereto can be a protein to which various modifications are added, such as the physiological modification of sugar chains, labeling with fluorescent,

radioactive or other substances, or fusion with other proteins. In particular, in the recombinants described hereinafter, there is a possibility of differences in modifications arising due to the sugar chains depending on the host in which it is expressed. Yet even if they have differences in the modification of sugar chains for example, as long as they exhibit properties similar to the Synoviolin protein disclosed in this specification, any of them are still the Synoviolin according to the present invention or functionally equivalent proteins.

**[0048]** Synoviolin can be obtained not only from biological materials, but also from recombinants wherein a gene that encodes it is incorporated into an appropriate expression system. Synoviolin can be obtained by genetic engineering techniques if the aforementioned polynucleotides that encode Synoviolin is incorporated into an appropriate expression system and expressed. An example of a host/vector system to which the present invention applies includes the expression vector pGEX-5X-3 and *E. coli*. pGEX-5X-3 can express a foreign gene as a fusion protein with glutathione S-transferase (GST) (Gene, 67:31-40, 1988). Accordingly, when pGEX-5X-3 containing a gene that encodes Synoviolin is transformed into an *E. coli* strain such as BL21 under heat shock and cultured for an appropriate length of time, and then isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) is added, the expression of GST-fusion Synoviolin is induced. A gene that encodes Synoviolin can be obtained by amplification by PCR or the like with a cDNA library of synovial cells or the like as a template. Because the GST according to the present invention is adsorbed to Glutathione Sepharose 4B, the expression product can be easily isolated and purified by affinity chromatography.

**[0049]** Other examples of host/vector systems used to obtain recombinants of Synoviolin include the following. First, when a bacterium is to be as the host, expression vectors of fusion proteins using a histidine tag, HA tag, Flag tag or the like are commercially available. As for yeast, yeast of the genus *Pichia* is known to be effective in the expression of protein with sugar chains. From point of the addition of sugar chains, expression systems that utilize a baculovirus vector with an insect cell as the host are also useful (Bio/Technology, 6:47-55, 1988). Moreover, transfection of vectors using CMV, RSV or SV40 or other promoters is performed using cells of mammals, and these host/vector systems can each be used as an expression system for Synoviolin. In addition, genes can also be introduced using retrovirus vectors, adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors or other virus vectors.

**[0050]** The novel protein Synoviolin provided by the present invention, and immunologically equivalent proteins are useful in the diagnosis of RA by utilizing its immunological characteristics. Antibodies that recognize Synoviolin are detected with a high frequency in the blood of RA patients, and are substantially not detected in the blood of healthy persons. Accordingly, performing an immunological analysis of the antibodies of a subject using the Synoviolin according to the present invention as an antigen gives useful information for the diagnosis of RA. To wit, if antibodies that react with Synoviolin are detected in the body fluids of a subject, then the subject may be diagnosed to have RA.

**[0051]** Many methods of performing the immunological analysis of antibodies are generally used. The most popular method among the various methods of performing immunological analysis of antibodies is the method reacting an antigen sensitization plate with antibodies in the sample and detecting, using an antibody-specific labeled antibody, the antibodies that are trapped on the surface of the plate and that is subjected to detection (Immunochemistry, 8: 871-879, 1971). A method that uses an enzyme as a labeling is called the ELISA method and is in broad use. In addition, there is also a known method of mixing the sample with latex particles to which antigens are adhered and detecting antibodies as an immunological agglutination reaction (Am. J. Med., 21:888-892, 1956). The immunological agglutination reaction is a method that permits rapid analysis with a single reagent, and this is a preferable method for large-scale screening.

**[0052]** Moreover, immunochromatography has recently become widespread as a simple analytical method. In order to apply this method to a method of immunological analysis of antibodies, a reaction system is constructed where the reaction between labeled Synoviolin and anti-Synoviolin antibodies is blocked by the antibodies in the sample. Specifically, for example, this is arranged so that the labeled Synoviolin and the sample can first contact with each other and then this can contact with the reagent component of anti-Synoviolin antibodies by a chromatographic development. If Synoviolin antibodies are present in the sample, then the labeled Synoviolin has already reacted, and accordingly, it cannot react any more with the anti-Synoviolin antibodies, which are the reagent component. By fixing the anti-Synoviolin antibodies and observing the state of the reaction of labeled Synoviolin in the region where the antibodies have been fixed, it is possible to perform an immunoassay by merely dripping samples.

**[0053]** In many immunoassays, it is possible to analyze antibodies according to the class of the antibodies. If necessary, information regarding a specific class of antibodies can be obtained by combining antibodies that can recognize classes of immunoglobulin such as IgG and IgM. In infectious diseases, a transition is observed where the IgM antibody measurements increase in the first stage of infection, and thereafter, the IgM antibody measurements decrease while the IgG antibody measurements increase. Such class-by-class antibody measurements may be associated with clinical symptoms of RA in the present invention also. More specifically, class-by-class measurements of antibodies may be linked to the judgment of drug efficacy or the prediction of RA onset.

**[0054]** In the detection of antibodies, methods are often adopted that use not only the antigen molecule itself but also chemically synthesized oligopeptides as the antigen. This is because using an analysis system that is specific to a particularly superior epitope or an epitope that has some clinical meaning is less affected by non-specific reactions.



This approach is effective for Synoviolin also. Specifically, it is possible to determine the domain that functions as an epitope, based on the aforementioned method of obtaining the immunologically active domain peptide. Epitopes are known to consist of at least three amino acid residues in some cases. In addition, immunological distinction from other proteins is said to be possible with at least 8 amino acid residues. Accordingly, fragments that consist of at least 8 consecutive amino acid residues, normally 9 amino acid residues, preferably 10 amino acid residues, and more preferably 11 amino acid residues selected from the amino acid sequence of Synoviolin and that react with antibodies in a patient's blood serum are preferable as the antigen for detecting antibodies in the present invention. Moreover, methods of increasing the immunological reactivity of epitope-forming oligopeptides by adding various modifications to the oligopeptides are also known to persons skilled in the art. For example, the modification of adding an inactive protein such as human blood serum albumin or a meaningless amino acid sequence contributes to improving the immunological reactivity.

[0055] The Synoviolin, which is useful in the method of detecting RA according to the present invention, functionally equivalent proteins thereto, or partial peptides thereof can be used as immunological analysis reagents for analyzing antibodies that recognize these molecules. The immunological analysis reagents according to the present invention are useful for the diagnosis of RA and the judgment of the effectiveness of treatment.

[0056] The Synoviolin according to the present invention also makes possible the development of vaccines for the purpose of curing or preventing RA. Since Synoviolin is thought to induce the hyperplasia of synovial cells by binding to its ligand, the treatment and prevention of RA can be achieved by providing a vaccine that gives an antibody that blocks the binding of Synoviolin to its ligand. Typical methods of obtaining a Synoviolin vaccine are methods for formulating by combining mainly the domain peptide serving as the epitope of Synoviolin, with an adjuvant or a carrier protein that gives an immune stimulus due to the domain peptides of Synoviolin, which originally a human protein.

[0057] Moreover, the present invention provides antibodies that recognize Synoviolin. Antibodies against Synoviolin can be obtained by known methods by taking as the immunogen the Synoviolin according to the present invention, its immunologically equivalent proteins or fragments thereof. Polyclonal antibodies may be obtained by ordinary immune manipulation (Harlow, E. & Lane, D.; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1988), while monoclonal antibodies may be obtained by cloning antibody-producing cells (Kohler, G. & Milstein, C., Nature 256: 495-7, 1975). Monoclonal antibodies are important tools for achieving high sensitivity and specificity in immunoassays.

[0058] In immunization, an immune animal is immunized with the Synoviolin according to the present invention (or an immunologically equivalent protein thereto or fragment thereof) along with an appropriate adjuvant. Synoviolin fragments that are useful as an immunogen include peptides comprising the following amino acid sequences:

**Syno-P3 (SLALTGAVVAHAYYC/SEQ ID NO: 3),**

**Syno-P2 (TCRMDVLRASLPAQS/SEQ ID NO: 4),**

and

**Syno-P1 (GAATTTAAGTSATAC/SEQ ID NO: 5).**

[0059] The immunogens prepared by linking these peptides to a carrier protein are specific to Synoviolin and give antibodies that have adequate binding affinity. Keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) or the like can be used as the carrier protein used to obtain the immunogen. The immune animals typically used include a rabbit, mouse, rat, goat or sheep. The adjuvants typically used include Freund's complete adjuvant (FCA) and the like (Adv. Tuberc. Res., 1:130-148, 1956). By adding immunity at appropriate intervals and drawing blood upon confirming the increase in the antibody titer, it is possible to obtain antiserum. Moreover, by purifying its antibody fractions, it is possible to obtain purified antibodies.

[0060] Alternatively, monoclonal antibodies can be obtained by collecting antibody-producing cells and cloning them by cell fusion or other methods. These antibody-producing cells include those derived from immune animals and also antibody-producing cells collected from RA patients that produce auto-antibodies against Synoviolin. Moreover, it is possible to construct chimeric antibodies or humanized antibodies based on the antibody genes of monoclonal antibody-producing cells derived from immune animals thus obtained. When antibodies are administered to humans, animal antibodies are not preferable because they will be eliminated as foreign matter. For this reason, chimeric antibodies wherein human antibodies are substituted for the constant regions of strongly antigenic antibodies, or humanized antibodies wherein human genes are substituted for not only the constant regions but also the framework of the variable regions are required. At this point, by using the variable regions of antibodies derived from antibody-producing cells



of RA patients, it is possible to reconstruct human-type antibodies, and accordingly, it is possible to construct highly safe antibodies more easily.

[0061] The chimeric antibodies or humanized antibodies that recognize Synoviolin provided based on the present invention are useful in a drug delivery system (DDS) that targets the synovial cells of RA patients. In a DDS that uses antibodies that recognize Synoviolin according to the present invention, Fas ligands or anti-SL antibodies or the like can be shown to be substances expected to be useful by linking to antibodies.

[0062] Alternatively, the antibodies of the present invention are useful in the detection of Synoviolin. Synoviolin is overexpressed in the synovial tissue of RA patients. Accordingly, the detection of Synoviolin in synovial cells, synovial tissue or body fluids gives important information for the diagnosis of RA. Specifically, when Synoviolin is detected in synovial tissue or blood, RA is thought to be advanced. The antibodies of the present invention can be used as reagents for the immunological detection of Synoviolin. Methods of using antibodies to immunologically detect the proteins present in tissue or blood are known. Reagents for the immunological analysis that contain the antibodies according to the present invention are useful in the diagnosis of RA and the determination of the effectiveness of treatment.

[0063] In addition, the antibodies according to the present invention can be used for the separation or detection of cells that express Synoviolin. The Synoviolin protein according to the present invention is observed in AER in development, and is also expressed strongly in undifferentiated mesenchymal cells that become the anlage of synovial membrane, cartilage, bone and limbs. Accordingly, Synoviolin can be used as a marker of AER and undifferentiated mesenchymal cells. To wit, it is possible to detect and separate AER and undifferentiated mesenchymal cells using the expression of Synoviolin as an index. The antibodies are appropriately labeled by fluorescence or the like. For example, antibodies against Synoviolin can be used in cell sorting or the like to separate cells that express Synoviolin. The separated undifferentiated mesenchymal cells are useful in the *in vitro* formation of bone and cartilage, or the reconstruction of joints.

[0064] The stroma of bone, cartilage, muscle, tendons, fat, bone marrow and the like are formed from undifferentiated mesenchymal cells *in vitro* or *in vivo* (S. A. Kuznetsov et al., J. Bone Miner. Res. 12, 1335-47, 1997; D. J. Prockop, Science 276, 71-4, 1997; C. M. Thompson and R. A. Young, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4587-90, 1995; A. I. Caplan, J. Orthop. Res. 9, 641-50, 1991; A. J. Friedenstein, Int. Rev. Cytol. 47, 327-59, 1976; M. Owen and A. J. Friedenstein, in "Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues," D. Evered and S. Harnett, Eds., Wiley, Chichester, UK, 1988, pp. 42-60; A. J. Friedenstein et al., Cell Tissue Kinet. 20, 263-72, 1987; B. A. Ashton et al., Clin. Orthop. Relat. Res. 151, 294-307, 1980; I. Bab et al., Clin. Orthop. Relat. Res. 187, 243-54, 1984; S. E. Haynesworth et al., Bone 13, 81-8, 1992; A. I. Caplan, Clin. Plant. Surg. 21, 429-35, 1994; also see, for example, the web site of Genzyme, <http://www.genzymebiosurgery.com/>).

[0065] For example, it is possible to differentiate undifferentiated mesenchymal cells *in vitro* and form cells of adipocytic lineage, chondrocytic lineage and osteocytic lineage (M. F. Pittenger et al., Science 284, 143-7, 1999).

[0066] Differentiation to adipocytes can be induced by, for example, treatment with 1-methyl-3-isobutylxanthine, dexamethasone, insulin and indomethacin (M. F. Pittenger, United States Patent No. 5,827,740, 1998). Differentiation to chondrocytes can be performed by, for example, using centrifugation or the like to make the cells into minute clumps and then stimulating with transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 3 in a culture medium that contains no blood serum (A. M. Mackay et al., Tissue Eng. 4, 415-28, 1998; J. U. Yoo et al., J. Bone Joint Surg. Am. 80A, 1745-57, 1998). Differentiation to osteocytes can be induced by dexamethasone,  $\beta$ -glycerophosphate and ascorbic acid in the presence of 10% fetal calf serum, for example (S. A. Kuznetsov et al., J. Bone Miner. Res. 12, 1335-47, 1997; D. J. Prockop Science 276, 71-4, 1997; C. M. Thompson and R. A. Young, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4587-90, 1995; A. I. Caplan, J. Orthop. Res. 9, 641-50, 1991; A. J. Friedenstein, Int. Rev. Cytol. 47, 327-59, 1976; M. Owen and A. J. Friedenstein, in "Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues," D. Evered and S. Harnett, Eds., Wiley, Chichester, UK, 1988, pp. 42-60; S. P. Bruder et al., J. Cell. Biochem. 64, 278-94, 1997; N. Jaiswal et al., J. Cell. Biochem. 64, 295-312, 1997; S. P. Bruder et al., J. Bone Miner. Res. 13, 655-63 1998).

[0067] In addition, regarding the *in vivo* case also, for example, undifferentiated mesenchymal cells can be transplanted *in utero* and differentiated into cartilaginous cells, fat cells, muscle cells, cardiac muscle cells, bone marrow stromal cells and thymus stromal cells (K. W. Liechty et al., Nature Medicine 6, 1282-1286, 2000). By these methods, it is possible to reconstruct tissue *in vitro* or *in vivo* from the separated undifferentiated mesenchymal cells. The reconstructed tissue or organs is expected to have application in regenerative medicine.

[0068] In addition, because Synoviolin is overexpressed in rheumatoid synovial cells, it can be used as a cell marker for rheumatoid synovial cells. If the antibodies according to the present invention are used as reagents for the separation or detection of cells, then the antibodies can be combined with other solvents or solutes to form a composition. For example, it can be combined with distilled water, pH buffers, salts, proteins, surfactants and the like.

[0069] Synoviolin is overexpressed in the synovial tissue of RA patients. In addition, antibodies that recognize Synoviolin (auto-antibodies) are detected with a high frequency in the blood of RA patients. On the other hand, Synoviolin antibodies are substantially undetectable in the blood of healthy persons. Moreover, Synoviolin suppresses the growth of cultured synovial cells *in vitro*. This is thought to be because Synoviolin competes with ligands that promote synovial

cell growth. Based on this information, the following mechanism can be expected. To wit, the overexpression of Synoviolin in synovial cells promotes the binding of Synoviolin, which has a growth-promoting action on synovial cells, to ligands, and as a result, growth of synovial cells is promoted. Moreover, the hyperplasia of these synovial cells itself is nothing other than the pathology of RA.

**[0070]** Based on the aforementioned knowledge, the present invention provides a method of detecting or method of diagnosing rheumatoid arthritis comprising the following steps of:

- i) detecting markers for rheumatoid arthritis present in a biological specimen from a subject, and
- ii) associating the results of detection of step i) with rheumatoid arthritis.

**[0071]** The markers used in the method of detecting or method of diagnosing rheumatoid arthritis according to the present invention may be any of the following markers. The method of measuring these markers is as described previously.

- Synoviolin or a polynucleotide functionally equivalent to Synoviolin,
- Synoviolin or a protein functionally equivalent to Synoviolin,
- Synoviolin or a peptide functionally equivalent to Synoviolin,
- Antibodies that bind to Synoviolin or a protein functionally equivalent to Synoviolin, and
- Antibodies that bind to Synoviolin or a peptide functionally equivalent to Synoviolin.

**[0072]** For example, if antibodies that react with Synoviolin or a protein or peptide functionally equivalent to Synoviolin are detected in a blood sample taken from a patient, then the probability that the patient has RA is high. Alternatively, the expression of Synoviolin or a protein functionally equivalent to Synoviolin in synovial tissue taken from a patient indicates the hyperplasia of synovial tissue due to RA. The expression of a protein can be detected using the presence of the protein or mRNA as an index.

**[0073]** In addition, the Synoviolin according to the present invention and the gene therefor provide new approaches to the development of drugs for the treatment of RA, based on the above mechanism and such. First of all, with the Synoviolin according to the present invention, ligands of Synoviolin can be detected using the binding activity to Synoviolin as an index. To wit, the present invention relates to a method of detecting the binding activity to Synoviolin comprising the following steps of:

- a) contacting a test compound with Synoviolin or a protein or peptide functionally equivalent to Synoviolin, and
- b) observing the binding of the test compound to said protein or peptide.

**[0074]** Moreover, it is possible to perform the screening of ligands for Synoviolin based upon the aforementioned detection method. The screening method according to the present invention specifically comprises the following steps of:

- a) detecting the binding activity of test compounds to Synoviolin or a protein functionally equivalent to Synoviolin by the aforementioned method of detecting the binding activity to Synoviolin, and
- b) selecting the test compounds the binding activity of which is higher than a control.

**[0075]** Candidate compounds for ligands include not only natural substances and variants thereof but also low-molecular weight organic compounds. Binding between the aforementioned proteins and candidate compounds can be detected directly by labeling the candidate compounds. Alternatively, this can be confirmed using the blocking of binding with a known SL as an index. To wit, the candidate compound is contacted with the protein according to the present invention in the presence of molecules that clearly exhibit the binding activity to proteins according to the present invention, such as S1-5. Alternatively, after the candidate compound is contacted with the protein according to the present invention, it is possible, by further contacting with SL, to evaluate the binding activity of the candidate compound. In the case where the blocking of binding is used as an index, only SL, which is already known, has to be labeled. Accordingly, this enables a simple screening method.

**[0076]** As a control, it is preferable that the same manipulation as in step a) be performed in the absence of the test compound. Alternatively, this may be a control where the test compound is present at a concentration lower than that of step a). In addition, it is also possible to perform the same manipulation in step a) using a molecule that is known to bind to Synoviolin in place of the test compound, and thus select compounds that have a binding activity higher than that of that molecule.

**[0077]** In addition, screening methods for ligands based on the genes shown in Examples are also possible. For example, a commercial two-hybrid system may be used to screen a library containing genes that encode candidate

ligands for genes that encode proteins that bind to Synoviolin. This method is an effective method of screening for natural ligands. Alternatively, it is possible to clone ligands by expression screening using a phage library into which cDNAs are incorporated and labeled Synoviolin. The present inventors used this screening method to discover the natural ligand of Synoviolin called SL. SL may possibly bind to Synoviolin on the surface of synovial cells and stimulate hyperplasia. Accordingly, the measurement of the level of SL in the blood may possibly be associated with the pathology of RA. SL can be measured based on the binding activity to Synoviolin. Naturally, an immunoassay can be performed with anti-SL antibodies, and SL can also be measured by a sandwich method that combines the two.

**[0078]** The present inventors confirmed that when Synoviolin is added to cultured synovial cells, it acts to suppress hyperplasia. This is explained in terms of the neutralization of SL in the culture medium as follows: the blocking of the binding of Synoviolin to its ligand conceivably leads to the suppression of hyperplasia of synovial cells, thereby conferring the effect of treating RA. Ligands that can be obtained by the screening method of the present invention competitively block the binding of Synoviolin to its natural ligand, and accordingly, they can be expected to have the activity of effectively suppressing the hyperplasia of RA synovial cells (as an antagonist).

**[0079]** In addition, the Synoviolin ligands that can be obtained by the screening method of the present invention can be expected to have the activity of stimulating the activity of Synoviolin (as an agonist) in the same manner as the aforementioned SL. Ligands that stimulate Synoviolin are useful as an agent that stimulates Synoviolin or an agent that promotes bone formation. More specifically, ligands that stimulate Synoviolin can be used as drugs to treat osteoporosis, bone disruption, sports injuries or the like.

**[0080]** These methods of detecting binding activity and screening methods can be expanded so that the present invention further provides a method of detecting the activity of blocking the binding of Synoviolin or a functionally equivalent protein to the Synoviolin ligand, and a method of screening compounds. The method of detecting the activity of blocking the binding of Synoviolin to the Synoviolin ligand based on the present invention comprises the following steps of:

- a) contacting the Synoviolin or a protein or peptide functionally equivalent to Synoviolin with its ligand in the presence of a test compound, and
- b) detecting the ligand and/or test compound that binds to said protein or peptide.

**[0081]** Moreover, based on the above-mentioned detection method, the present invention provides a method of screening for compounds that block the binding of Synoviolin or a protein functionally equivalent thereto to the Synoviolin ligand. To wit the present invention relates to the following screening method comprising the steps of:

- a) detecting the activity of test compounds to block the binding of Synoviolin or a protein functionally equivalent thereto to its ligand by the aforementioned detection method, and
- b) selecting the test compounds said blocking activity of which is higher than a control.

**[0082]** As a control, it is preferable that the same manipulation as in step a) be performed in the absence of the test compound. Alternatively, this may be a control where the test compound is present at a concentration lower than that of step a). In addition, for example, it is also possible to perform the same manipulation in step a) using a molecule that is known to block the binding between Synoviolin and its ligand in place of the test compound, and thus select compounds that have a binding activity higher than that of that molecule.

**[0083]** By this screening, it is possible to obtain compounds that act as an antagonist to Synoviolin or functionally equivalent proteins thereto. Examples of ligands of Synoviolin include the SL (S1-5) recited in Examples. Specifically, the S1-5 proteins identified by accession number AAA65590, I38449, NP\_061489, NP\_004096 or Q12805, or similar proteins can be used as long as they have the activity of binding to the Synoviolin protein (Lecka-Czernik, B. et al., Mol. Cell. Biol. 15, 120-128, 1995; Heon, E. et al., Arch. Ophthalmol. 114, 193-198, 1996; Ikegawa, S. et al., Genomics 35, 590-592, 1996; Katsanis, N. et al., Hum. Genet. 106, 66-72, 2000; Giltay, R. et al., Matrix Biol. 18, 469-480, 1999; Stone, E. M. et al., Nat. Genet. 22, 199-202, 1999). The contact between Synoviolin and Synoviolin ligand can be made before, after or at the same time that the candidate compound is applied.

**[0084]** The compounds to be screened here are those that are thought to bind to Synoviolin and block the binding of Synoviolin to the ligand, and those that block the ligand. Compounds that bind to Synoviolin can be screened by labeling the ligand and by making it compete with the candidate compound. If a compound that binds to the ligand is a candidate, then the opposite is performed. In each screening, it is preferable that radioactive isotopes are used for labeling, because their effect on activity is small. An antagonist of Synoviolin thus obtained is presumed to have the action of suppressing the hyperplasia of synovial cells, and can be expected to have the effect of treating RA.

**[0085]** In addition, the Synoviolin ligand S1-5 is suggested to be a causal gene for Malattia Leventinese (ML) and Doyne honeycomb retinal dystrophy (DHRD) (Stone, E. M. et al., Nature Genetics 22, 199-202, 1999). These diseases have symptoms similar to age-related macular degeneration (AMD) wherein deposits known as drusen occur. Because

of these, there is a possibility that Synoviolin contributes to ML and DHRD. Diagnosing ML and DHRD can be performed by investigating the mutations and polymorphism of synoviolin. In addition, compounds that act as ligands of Synoviolin obtainable by the screening according to the present invention, compounds that block the interaction between Synoviolin and S1-5 and the like are expected to have use as drugs that contribute to the prevention or treatment of these diseases.

[0086] In addition, it is possible to use the Synoviolin according to the present invention to evaluate the activity of a compound to regulate signal transduction via Synoviolin, or to screen for compounds that regulate signal transduction via Synoviolin. Specifically, the present invention provides a method of detecting the activity of a test compound to regulate signal transduction via Synoviolin, comprising the following steps of:

- a) contacting the test compound with Synoviolin either in the presence of, or in the absence of, the Synoviolin ligand, and
- b) detecting signal transduction via Synoviolin.

[0087] In addition, the present invention relates to a method of screening for compounds that have the activity of regulating signal transduction via Synoviolin, comprising the following steps of:

- a) detecting the activity of test compounds to regulate signal transduction via Synoviolin by the aforementioned method, and
- b) selecting the test compounds said regulation activity of which is higher than a control.

[0088] As a control, it is preferable that the same manipulation as in step a) be performed in the absence of the test compound. Alternatively, this may be a control where the test compound is present at a concentration lower than that of step a). In addition, for example, it is also possible to perform the same manipulation in step a) using a molecule that is known to have the activity of promoting or blocking the signal transduction via Synoviolin in place of the test compound, and thus select compounds that have a regulating activity higher than that of that molecule.

[0089] In the present invention, signal transduction via Synoviolin is defined to be that the stimulus applied to Synoviolin is transduced to different molecules. There is no limitation on the type of stimulus. Many modes of signal transduction are known to be present in the body. A representative example of signal transduction is the regulation of activity by the modification of proteins. For example, the activity of certain types of proteins is regulated by phosphorylation or acetylation. In addition, the activity of a protein is known to be controlled by its cleavage. In order for a protein to be cleaved in a more specific manner, the presence of ubiquitin or other molecules is important. Signal transduction can be detected by using as an index the change in the activity or structure of molecules that constitute signal transduction where the change is generated by the transduction of signals. Alternatively, signal transduction can be detected using as an index the formation of complexes for signal transduction.

[0090] Examples of signal transduction especially include phosphorylation or dephosphorylation signals. Many of cell proliferation signals are known to be transduced to downstream signal molecules via protein modification based on protein phosphorylation or dephosphorylation. Since the Synoviolin according to the present invention also has a cell proliferation action, this suggests that signal transduction via Synoviolin is also transduced by phosphorylation of protein. In fact, the present inventors discovered the phosphorylation action of Synoviolin expression. Accordingly, it is possible to measure signal transduction via Synoviolin by detecting the phosphorylation of protein.

[0091] Receptors involved in cell proliferation or differentiation have the following domains as enzyme active sites (*Jikken Igaku Bessatsu Bioscience Yogo Raiburari, Kaiteiban Saitokain Zoshoku Inshi* [Experimental Medicine, Supplement - Bioscience Terminology Library, Revised Version: Cytokines/Growth Factors], Yodosha Co., Ltd., 1998):

- the tyrosine kinase domain (VEGF receptor, PDGF receptor, HGF receptor, EGF receptor, etc.),
- the tyrosine phosphatase domain (RPTP, etc.), and
- the serine/threonine kinase domain (TGF $\beta$  receptor, etc.).

[0092] Synoviolin is predicted to keep these enzyme activities either directly or indirectly. The phrase "having an enzyme activity indirectly" refers that there is no enzyme activity site in the Synoviolin molecule, but a molecule that is associated with Synoviolin has an enzyme activity. Known examples of such molecules include the TNF receptor, GM-CSF receptor and the like. Accordingly, by detecting the phosphorylation activity on tyrosine, serine and/or threonine, for example, it is possible to evaluate signal transduction via Synoviolin. At this time, by evaluating the action of the test compound in the presence of Synoviolin ligand, it is possible to evaluate the effect of the test compound on the signal transduction of Synoviolin triggered by a Synoviolin ligand. Specifically, it is possible to detect the activity of blocking or suppressing the signal transduction via a Synoviolin ligand to Synoviolin. As the Synoviolin ligand, the Synoviolin ligand S1-5 described herein can be used. Alternatively, by evaluating the action of the test compound in

the absence of Synoviolin ligand, it is possible to evaluate the stimulation activity of the test compound to Synoviolin.

[0093] In order to detect the phosphorylation of protein, for example, Synoviolin-expressing cells together with the test compound and [<sup>32</sup>P] orthophosphate are incubated both in the presence of, and in the absence of the Synoviolin ligand. Next, by immune precipitation, the phosphorylated protein is recovered from this cytolysis product. After frac-

tionation by SDS-PAGE, the phosphorylation of the protein thus recovered can be detected by autoradiography. Phosphorylated amino acids can be identified by TLC or other known methods of peptide analysis.

[0094] Alternatively, phosphorylated tyrosine antibodies or other antibodies specific to phosphorylated protein can be used to detect the phosphorylation of specific amino acids.

[0095] Typically, the phosphorylation of signal-transduction factors in the cell is transduced sequentially to a plurality of molecules. To wit, a series of transduction paths constitutes a cascade. For this reason, by evaluating changes in the phosphorylation level of the entire protein in the cell, it is possible to compare the magnitude of the phosphorylation signal occurring in the cell. Methods of evaluating the phosphorylation level of the total protein in the cell are known. For example, after cells are stimulated with Synoviolin ligand or the like, the protein is fractionated by SDS-PAGE and blotted on a filter, and then the phosphorylation level of the entire protein can be evaluated by Western blot using anti-phosphorylated tyrosine antibodies or the like. In addition, for example, the cells are labeled with [<sup>32</sup>P] orthophosphate, and the cells are stimulated with Synoviolin ligand or the like. Then, the cell protein is expanded with two-dimensional electrophoresis. The protein is stained with Coomassie blue and autoradiography is performed. By detecting the phosphorylated spot, it is possible to evaluate the phosphorylation level.

[0096] Alternatively, it is possible to specifically measure the change in the phosphorylation level in the phosphorylated protein that is the substrate of Synoviolin. The phosphorylated protein that is the substrate of Synoviolin is, for example, recovered from the phosphorylated spot in the aforementioned two-dimensional electrophoresis and can be identified by microsequencing or mass spectrometry. Changes in the phosphorylation level of the identified substrate protein is subjected to, for example, immune precipitation using antibodies specific to the substrate protein, and after fractionation by SDS-PAGE, the intake of [<sup>32</sup>P] may be measured by autoradiography or evaluated by Western blotting using anti-phosphorylated tyrosine antibodies (*Baio Maryuaru Shirizu - Bunshi Seibutsugaku Kenkyu no Tame no Tampaku Jikken Ho* [Bio Manual Series - Protein Experimental Methods for Molecular Biology Research], Tadaomi Takenawa, Masaki Inagaki eds.).

[0097] Examples of cells used in the aforementioned method include synovial cells (e.g. RTF) and cells into which the synoviolin gene is exogenously transferred. If the level of phosphorylation or dephosphorylation due to Synoviolin decreases for a certain test compound, then the compound is judged to be a compound that blocks signal transduction via Synoviolin. In addition, if the level of phosphorylation or dephosphorylation due to Synoviolin increases for a certain test compound, then the compound is judged to be a compound that promotes signal transduction via Synoviolin.

[0098] For example, in the case where Synoviolin functions as a receptor-type tyrosine kinase and the downstream molecule is activated via tyrosine phosphorylation to transduce a signal, if tyrosine phosphorylation is suppressed by the test compound, then this compound is judged to be a compound that blocks signal transduction via Synoviolin. In addition, the present invention relates to a method of blocking signal transduction via Synoviolin using, for example, tyrosine kinase, tyrosine phosphatase or serine/threonine kinase or other protein kinase or phosphatase blocker.

[0099] In addition, another good example of signal transduction via Synoviolin is ubiquitination signals. A protein structure prediction system (SMART: Simple Modular Architecture Research Tool (also see the web site <http://smart.embl-heidelberg.de/>) Schultz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857-5864, 1998; Schultz et al., Nucleic Acids Res. 28, 231-234, 2000) demonstrated the presence of a ring finger motif in Synoviolin (Joazeiro, C. A. et al., Science 286, 309-312, 1999). This motif is known to be present in the E3 ubiquitin-protein ligase related to the decomposition of protein. In addition, the ring finger motif is thought to be the binding site for E2 ubiquitin-conjugating enzymes.

[0100] Accordingly, by detecting the ubiquitination signal due to Synoviolin, it is possible to evaluate signal transduction via Synoviolin. The ubiquitination signal is evaluated, for example, by detecting ubiquitination of the substrate protein using anti-ubiquitin antibodies. In addition, the binding of Synoviolin to E2 ubiquitin-conjugating enzyme or substrate protein, or the Synoviolin-containing ubiquitin ligase complex may also be detected. Specifically, for example, cells transfected with a vector that expresses tagged Synoviolin are ruptured and [<sup>32</sup>P]-labeled ubiquitin is added. After reaction is allowed to proceed, immunoprecipitation is performed with anti-tag antibodies. The ubiquitin ligase activity of Synoviolin can be detected by SDS-PAGE and performing autoradiography (Hashizume, R. et al., J. Biol. Chem. 276, 14537-14540, 2001).

[0101] Changes in the level of ubiquitination in the substrate protein of Synoviolin can be measured specifically. The substrate protein of Synoviolin can be identified by, for example, yeast two-hybrid screening using Synoviolin as a bait. Changes in the ubiquitination level of the identified substrate protein can be evaluated as follows: the tagged substrate is purified, and purified E1, E2, E3 and ubiquitin are added thereto. After reaction is allowed to proceed, immune precipitation is performed with anti-tag antibodies, and staining is performed with anti-ubiquitin antibodies (Yokouchi, M. et al., J. Biol. Chem. 274, 31707-31712, 1999).

[0102] If the activation of the ubiquitination signal by Synoviolin decreases for a certain test compound, then the

compound is judged to be a compound that blocks signal transduction via Synoviolin. In addition, if the activation of the ubiquitination signal increases for a certain test compound, then the compound is judged to be a compound that promotes signal transduction via Synoviolin. For example, compounds that inhibit the interaction between Synoviolin and E2 ubiquitin activation enzyme can effectively inhibit the ubiquitination signal via Synoviolin. In addition, the present invention provides a method of using an inhibitor of enzymes related to the ubiquitination signal to shut off signal transduction via Synoviolin. For example, by applying the E2 ubiquitin conjugating enzyme or the E3 ubiquitin ligase inhibitor to cells, it is possible to block signal transduction via Synoviolin.

[0103] The method described above can be used to select compounds that have the activity of regulating signal transduction via Synoviolin. Compounds that block signal transduction via Synoviolin are useful as agents for the treatment of diseases caused by the activation of Synoviolin. For example, compounds that block signal transduction via Synoviolin are useful in synovial hyperplasia blocking. By administering these compounds, it is possible to suppress synovial hyperplasia and thus it is possible to prevent or treat diseases such as RA that involve synovial hyperplasia. In addition, these compounds may also be used as drugs for treating ML and DHRD. Alternatively, compounds that promote signal transduction can be used as an agent that stimulates Synoviolin, or agent that promotes bone formation, etc. For example, they can be used as drugs for treating osteoporosis, bone disruption, sports injuries or the like.

[0104] Based on the discovery of the synoviolin gene, the following new research becomes possible regarding RA and other diseases in which Synoviolin is involved. First, it is possible to determine the structure of the promoters or enhancers that control the expression of Synoviolin. To wit, it is possible to advance the cloning of the genome based on the nucleotide sequence of the synoviolin gene shown in SEQ ID NO: 1, and analyze the sequence of the expression control domain. The thus-obtained transcription regulation domain for synoviolin can be used in the search for a transcription regulating factor for synoviolin.

[0105] In addition, in the synoviolin knock-out animal according to the present invention, if a marker gene is knocked in and the marker gene is expressed under the control of the endogenous promoter of the synoviolin gene, it is possible to perform a screening for drugs that control the expression of the synoviolin gene, using this animal or the animal-derived cells with the expression of the marker gene as an index. For example, if the recognition sequence for the transcription regulating factor is given as a double strand, then it functions as a decoy nucleic acid drug.

[0106] In addition, the polynucleotide according to the present invention may be used to examine, in animals, the biological role of the protein according to the present invention. In order to do this, for example, the DNA according to the present invention is introduced and the protein according to the present invention is overexpressed or expressed at different locations (or expressed at different times). Thus, its role can be examined by verifying its effect. A gene can be transferred into the entire body by preparing a transgenic animal of the DNA according to the present invention. Alternatively, through gene targeting and the administration of antisense oligonucleotides, ribozymes and the like, loss-of-function experiments on the suppression of the expression and functions of the DNA of the present invention are also effective. To wit, the present invention provides transgenic non-human vertebrate in which the expression of the DNA of the present invention is modified or said modifications can be induced. Expression may be modified in comparison to that of the wild type or, in the case where modification is induced, expression may be modified in comparison to that before the induction.

[0107] The transgenic animals according to the present invention include animals wherein exogenic nucleic acids are transferred into the genome. In addition, the "expression of DNA" may be at the DNA transcription level or at the translation level of transcripts. In addition, the "induction of modifications" may include the induction of modification by external stimulus or modification of stage-specific expression, or that expression is modified in later generations due to cross-breeding. In addition, it includes the modification of expression in some cells or tissues. Examples of the transgenic non-human vertebrates according to the present invention preferably include mammals (e.g., mouse, rat, hamster, rabbit, pig, goat, sheep, horse and bovine), while rodents, e.g. mouse and rat and the like are particularly used.

[0108] The transgenic non-human vertebrates according to the present invention include transgenic non-human vertebrates into which DNA that encodes the protein according to the present invention is exogenously introduced. Such transgenic animals can be produced by, for example, injecting, into a fertilized egg, a vector that expresses the DNA that encodes the protein according to the present invention.

[0109] The transfer of vectors can be performed by treatment with calcium phosphate after the mixing of vector and egg, electroporation, or microinjection under an inverted microscope, etc. In addition, the transfection is also performed by transferring a vector according to the present invention into an embryonic stem cell (ES cell), and by performing the microinjection of a selected ES cell into a fertilized egg (blastocyst).

[0110] The fertilized egg thus obtained may be implanted into the fallopian tubes of a recipient in which a false pregnancy is induced through mating with a vasectomized male individual, thereby obtaining a newborn. DNA is prepared from the tail of the newborn or the like and PCR is used to confirm that the transferred DNA was kept (Brigid Hogan et al. eds., "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, 1994, Gordon, J. W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384, 1980; Jaenisch, R and B. Mintz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1250-1254, 1974). A heterozygote can be obtained from a chimeric animal into which the genes are transferred

into the germ line by breeding with a normal animal. A homozygote can be obtained by the breeding of two heterozygotes. The transgenic non-human vertebrates according to the present invention include these and their descendants.

[0111] Examples of the promoters used for expressing the DNA of the present invention *in vivo* include whole body expression type promoters and tissue-specific and stage-specific promoters.

[0112] Examples of whole body expression type promoters include  $\beta$ -actin promoters and the like. For example, chicken  $\beta$ -actin promoter linked to a human cytomegalovirus enhancer contained in pCAGGS or the like may be used. In the case of preparing a transgenic animal wherein the DNA according to the present invention is expressed in a site-specific or stage-specific manner, a Cre-loxP system or the like can be used. For example, a transgenic animal having a Cre recombinase gene downstream of a site-specific or stage-specific promoter is prepared and separately a transgenic animal having a vector in which DNA that encodes the polypeptide of the present invention is linked downstream of a general-use promoter is prepared. At this time, a transcription termination signal or the like or a stop codon sandwiched between a loxP pair is inserted between the promoter and the DNA that encodes the polypeptide of the present invention. By mating two individuals, it is possible to express the polypeptide of the present invention with the expression of Cre.

[0113] In addition, the transgenic non-human vertebrates according to the present invention encompass transgenic non-human vertebrates wherein the expression of DNA that encodes the endogenous protein of the present invention is suppressed. Such transgenic animals can be prepared by gene targeting, for example. In order to produce such transgenic non-human vertebrates, for example, a targeting vector wherein some or all of the DNA according to the present invention is made defective by substitution, deletion, addition and/or insertion or the like is inserted into an embryonic stem (ES) cell, and cells wherein homologous recombination with chromosome DNA has occurred are selected. Known methods of positive and negative selection can be performed in order to select homologous recombinants. Examples of markers used for positive selection include the neomycin resistance gene or other drug resistance genes, while examples of markers used for negative selection include the diphtheria toxin (DT)-A gene, HSV-tk gene and the like. Southern blotting, PCR or the like can be used to select correctly recombined cells. The cells thus obtained are inserted into a fertilized ovum at roughly the eight-cell stage or into the blastocoel of a blastocyst or the like, and transferred to the uterus of a pseudopregnant female individual prepared by mating with a vasectomized male. Genomic DNA analysis of the newborn is performed in the same manner as above, and a heterozygote or homozygote can be obtained. Not only the target gene can be knocked out, but another gene can also be knocked in. There is no particular limitation on the knocked-in genes. Examples include the *lacZ* gene or other marker genes.

[0114] In addition, transgenic non-human vertebrates wherein the expression of the DNA that encodes the endogenous protein according to the present invention is suppressed may be prepared using the antisense method or ribozyme method. In the antisense method, a vector containing DNA that encodes RNA complementary to the DNA transcription product that encodes the protein according to the present invention, or in the ribozyme method, for example, a vector containing DNA that encodes RNA that cuts the transcription product of DNA that encodes the protein according to the present invention is inserted into an embryonic stem cell of a mammal in the same manner as above. This is injected into a mammal embryo and individuals are obtained from the embryo.

[0115] Since Synoviolin induces the synovial hyperplasia symptoms of RA, the following applications are conceivable for transgenic animals. To wit, after incorporating the synoviolin gene or SL gene into an appropriate animal to form a transgenic animal, it can be used as a model for RA by inducing overexpression. In this transgenic animal, it is possible to proceed with the screening of drugs that control the mechanism of synovial hyperplasia. Alternatively, in animals wherein the RA symptoms do not occur with human Synoviolin/SL, they can be utilized as a source of supply of Synoviolin or SL by inducing the overexpression of these genes.

[0116] Transgenic animals that express the synoviolin gene exhibit symptoms common to RA such as arthritis accompanying synovial hyperplasia. To wit, these animals become rheumatoid arthritis model animals. These animals can be used to perform the testing or screening of various compounds including candidate compounds for RA drugs. By administering test compounds to the transgenic animals, it is possible to observe the remission or exacerbation of symptoms to verify the effectiveness of compounds or perform screening. Examples of methods of using the transgenic animals according to the present invention to perform testing or screening include the following methods.

[0117] A method of testing or screening for compounds that cause the remission or exacerbation of joint abnormalities, which is a method comprising the steps of: (a) administering a test compound to a transgenic non-human vertebrate into which the DNA according to the present invention is exogenously inserted, and (b) evaluating the joint abnormalities of the animal to which it was administered.

[0118] In addition, synoviolin gene knock-out animals can be used to examine the side effects caused by the suppression of the action of Synoviolin, and can be used in the assay or screening of drugs that reduce these side effects.

In addition, by expressing Synoviolin locally or transiently in knock-out animals, it is possible to perform the specific verification of the effects of Synoviolin. In addition, from the association of SL (S1-5) and ML/DHRD, it is possible that Synoviolin may contribute to the intracellular signal transduction of SL, and thus, synoviolin knock-out animals may become models of ML or DHRD. For example, a tissue-specific or stage-specific (homozygous or heterozygous) knock-



out of the synoviolin gene is conceivable.

[0119] A knock-in animal wherein a marker gene or the like is introduced at the time of the knock-out of the synoviolin gene can be used to detect the activity of the compound to increase or decrease the expression of the synoviolin gene. To wit, the present invention relates to a method of detecting the activity of a test compound to regulate the expression of the synoviolin gene, comprising the following steps of:

- a) applying the test compound to the aforementioned knock-in animal or knock-in cells, and
- b) measuring the expression level of the marker gene.

[0120] This detection method can be used in the screening of compounds that regulate the expression of the synoviolin gene. This method is a screening method for compounds that regulate the expression of the synoviolin gene, comprising the following steps of: a) applying the test compound to the aforementioned knock-in animal or knock-in cells, b) measuring the expression level of the marker gene, and c) selecting compounds that increase or decrease the expression of the knocked-in gene.

[0121] To wit, in the animal or cell to which the test compound is applied, the expression of the marker gene is detected and compounds that increase or decrease the expression of the marker gene are selected. The detection of the expression of the marker gene in the case that *LacZ* is used as a marker can be performed by the method recited in Examples. By this method, in addition to the testing or screening using individuals, for example, it is possible to use isolated organs or tissues and perform similar testing or screening using cells obtained from transgenic animals.

[0122] In screening using individuals, the test compound is administered via an appropriate route. The test compound may be administered by known methods of administration such as intravenous injection, hypodermic injection, intramuscular injection, intraabdominal injection, oral administration, rectal administration, nasal administration or the like. In the event that screening is performed using a test tube culture system, the test compound may be added to the culture medium, for example. Alternatively, it may be injected into the cell by microinjection or other methods. In the event that the test compound is a gene, the naked DNA may be combined with a desired transfection reagent or incorporated into a known expression vector and the gene is introduced into the cell. Nucleic acids that include the sequence of the promoter domain of the synoviolin gene are expected to act as a decoy and suppress the expression of Synoviolin.

[0123] The activity of regulating the expression of the synoviolin gene can be detected, for example, by the following steps of:

- a) contacting a test compound with an expression system that expresses a reporter gene under the control of the endogenous promoter of Synoviolin or a polynucleotide functionally equivalent to Synoviolin, and
- b) measuring the expression level of the reporter gene.

[0124] Moreover, based on this detection method, the screening of compounds that regulate the expression of the synoviolin gene can be performed. To wit, the present invention relates to a method of screening for compounds that regulate the activity of endogenous promoters of Synoviolin or polynucleotides functionally equivalent to Synoviolin, comprising the following steps of:

- a) measuring the activity of test compounds to regulate the activity of the endogenous promoter of Synoviolin or a polynucleotide functionally equivalent to Synoviolin by the aforementioned method of detecting activity, and
- b) selecting the test compounds that have a difference in said activity in comparison to a control.

[0125] As a control, the same manipulation as in step a) may be performed in the absence of the test compound. Alternatively, this may be a control wherein the test compound is present at a concentration lower than that of step a). In addition, it is also possible to perform the same manipulation in step a) using a different compound, for example, and thus select compounds that have an action higher than that of that compound. The expression of genes includes expression at the transcription level or expression at the translation level. The gene linked downstream of the endogenous promoter of the synoviolin gene may be the natural synoviolin gene itself or an artificially linked reporter gene. The endogenous promoter activity of the synoviolin gene can be determined by detecting the transcription products or translation products of said gene by, for example, Northern hybridization using cDNA fragments of a gene linked downstream as the probe, RT-PCR, Western blotting using antibodies to the proteins encoded by said gene, immune precipitation, ELISA or other methods.

[0126] In addition, by producing a construct wherein a reporter gene is linked downstream of the promoter of the synoviolin gene, and using the transformed cell obtained by transfecting this into a cell, it is possible to perform screening using the expression of the reporter gene as an index. Such a construct can be prepared by linking the desired reporter gene downstream of the genome DNA in the upstream domain of the synoviolin gene that contains the promoter



of the synoviolin gene. There are no particular limitations on the reporter gene, and examples include LacZ, chloramphenicol acetyl transferase (CAT), luciferase, GFP (green fluorescent protein) and others. Compounds that decrease the expression of the synoviolin gene are candidates for drugs for treating RA.

[0127] There are no particular limitations on the test compounds used in the testing or screening according to the present invention, and examples thereof include organic compounds, inorganic compounds, peptides, proteins, natural or synthetic low-molecular weight compounds, natural or synthetic polymers, extracts of tissues or cells, microbial culture supernatants and natural ingredients derived from plants or marine organisms, but they are not limited to these. Expression products of gene libraries or expression cDNA libraries and the like may also be used. In addition, compounds obtained by the aforementioned screening of compounds that bind to Synoviolin, or by screening of compounds that block the binding of Synoviolin to SL can also be administered as test compounds.

[0128] There are no particular limitations on the method of administering compounds, and this can be performed *in vitro* by contact with cells, including addition to culture medium, or by the introduction into cells using a microinjector or transfection reagent, etc. This can be performed *in vivo* by intraarterial injection, intravenous injection, hypodermic injection, intraabdominal administration, oral administration, rectal administration, intramuscular administration, eye drops, nasal administration, local injection into joints, etc., or other methods known to persons skilled in the art. The compounds are administered as an appropriate composition obtained by mixing with water, physiological saline solution, buffer solution, salt, stabilizer, preservative, suspension agent or the like.

[0129] In addition, the screening of compounds that regulate the expression of the synoviolin gene can be performed using not only transgenic animals but also normal animals or cells or the like derived from those animals. For example, the present invention relates to a method of detecting the activity of regulating the expression of Synoviolin or polynucleotides functionally equivalent to Synoviolin, comprising the following steps of:

a) culturing cells that express Synoviolin or a polynucleotide functionally equivalent to Synoviolin in the presence of a test compound, and

b) measuring the expression level of said polynucleotide.

[0130] Moreover, based on this detection method, the screening of compounds that regulate the expression of the synoviolin gene can be performed. To wit, the present invention relates to a method of screening for compounds that regulate the expression of Synoviolin or polynucleotides functionally equivalent to Synoviolin, comprising the following steps of:

a) detecting the activity of test compounds to regulate the expression of Synoviolin or a polynucleotide functionally equivalent to Synoviolin based on the aforementioned method of detecting activity, and

b) selecting the test compounds that have a difference in said activity in comparison to a control.

[0131] The expression level of Synoviolin or a polynucleotide functionally equivalent to Synoviolin can be measured by the aforementioned method. In addition, all compounds that can be used as test compounds in the aforementioned and other screening methods can be used as the test compound in this screening method. As a control, the same manipulation as in step a) can be performed in the absence of the test compound, as described above.

[0132] Compounds identified by the testing or screening methods according to the present invention become candidates for drugs for RA and other diseases in which Synoviolin is involved, and thus, they can be used for the prevention or treatment of RA and other diseases. These compounds can consist of the active ingredient appropriately combined with other solutes or solvents to form pharmaceutical compositions. In the case of using, as a pharmaceutical agent, a compound isolated by the screening method according to the present invention, it is possible to administer the isolated compound itself directly to patients, or the compound may be administered as a pharmaceutical composition prepared by known pharmaceutical methods.

[0133] For example, it can be prepared and administered appropriately in combination with any pharmaceutically acceptable carrier or medium, specifically sterilized water, physiological saline solution, plant oils, emulsifiers, suspension agents or the like. The pharmaceutical composition according to the present invention may take the form of an aqueous solution, tablet, capsule, troche, buccal tablet, elixir, suspension, syrup, nose drops, inhalation solution or the like. The content of the compound may be determined appropriately. Administration to patients may be performed typically by intraarterial injection, intravenous injection, hypodermic injection, oral administration, injection in the joint, etc., or other methods known to persons skilled in the art.

[0134] While the dosage varies depending on the weight and age of the patient, the method of administration, symptoms and the like, a person skilled in the art would be able to select the dosage appropriately. The typical dosage would differ depending on the effective blood concentration and the metabolism time of the drug, but the daily maintenance dose is thought to be about 0.1 mg/kg to about 1.0 g/kg, or preferably about 0.1 mg/kg to about 10 mg/kg, or even more preferably about 0.1 mg/kg to about 1.0 mg/kg. Administration can be performed either at one time or divided

into several times. In addition, as long as said compound can be encoded by the polynucleotide, gene therapy can be performed by incorporating said polynucleotide into a gene therapy vector.

[0135] All prior art references cited herein are incorporated by reference.

## 5 Brief Description of the Drawings

### [0136]

FIG. 1 indicates photographs of positive colonies in immunoscreening by anti-synovial cell anti-serum.

FIG. 2 indicates a photograph showing the expression of Synoviolin recombinant protein in *E. coli*.

FIG. 3 indicates a photograph of an autoradiograph showing the Synoviolin protein expression translated from synoviolin cDNA *in vitro*.

FIG. 4 indicates a photograph of an autoradiograph showing the results of analysis of synoviolin gene expression by Northern blotting using the cDNA of Synoviolin as a probe.

FIG. 5 indicates photographs showing the results of Western blotting using anti-synovial cell anti-serum on various cell extracts, and the results of antibody absorption experiments with GST-partial Synoviolin. The arrow shows the absorbed band. The molecular weights of the various bands are approximately 220, 185 and 140 kDa in order from the top.

FIG. 6 indicates a photograph of an autoradiograph showing the results of Western blotting using anti-synovial cell anti-serum on synovial cell extracts. The left lane (pre-immune) is rabbit anti-serum prior to immunization of synovial cell, while the right lane (post-immune) is synovial cell anti-serum.

FIG. 7 indicates fluorescent microphotographs showing the results of fluorescent immunostaining on synovial cell with anti-synovial cell anti-serum (A) and purified anti-synovial cell antibodies (B).

FIG. 8 indicates microphotographs showing the results of immunostaining using anti-synovial cell anti-serum on synovial tissue, and the results of antibody absorption experiments with GST-partial Synoviolin.

FIG. 9 indicates microphotographs showing the results of immunostaining using purified anti-synovial cell antibody on synovial tissue. The results using anti-serum purified by a GST affinity column (upper panel) and anti-serum purified by a GST-partial Synoviolin affinity column (lower panel) are shown.

FIG. 10 indicates a photograph of an autoradiograph showing the results of detection of anti-Synoviolin antibodies in various types of human blood serum by Western blotting.

FIG. 11 indicates a photograph of an autoradiograph showing the results of analysis of the expression of the SL gene in synovial cells by Northern blotting using the cDNA of SL as a probe.

FIG. 12 indicates a photograph of an autoradiograph showing the binding between [<sup>35</sup>S]-labeled HA-Synoviolin-HA-HA and GST-SL fusion protein.

FIG. 13 indicates a diagram showing the results of analyzing the effect of Synoviolin on hyperplasia of synovial cells by MTT assay. GST-partial Synoviolin was used.

FIG. 14 indicates a diagram showing the structure of the synoviolin gene introduction vector. Synoviolin is systemically expressed using a  $\beta$ -actin promoter which has a CMV enhancer. The anti-Flag-tag antibody can be used to confirm the expression of the Flag tag-fusion Synoviolin protein.

FIG. 15 indicates photographs showing toe joints that exhibit arthritis in a transgenic mouse with the synoviolin gene. The appearance and soft X-ray image of the toe of a Synoviolin forced-expression mouse are shown. A soft X-ray image of the toe of a normal mouse is shown at right for comparison. The Synoviolin forced-expression mouse exhibited marked swelling of the toe.

FIG. 16 indicates photographs showing the histological findings on toe joint that exhibits arthritis in a transgenic mouse with the synoviolin gene. In the joint portions of toes that exhibited marked swelling, marked bone disruption and abnormal bone formation accompanying synovial hyperplasia were found.

FIG. 17 indicates photographs showing the histological findings on normal toe joint of a gene-introduced mouse. No abnormal joint cartilage, bone disruption or synovial hyperplasia were found. The lower right panel shows the results of immunostaining with anti-Flag antibodies. No positive signal was observed.

FIG. 18 indicates photographs that show the expression of Synoviolin in toe joints that exhibit arthritis in a synoviolin gene transgenic mouse. Immunostaining with anti-Flag antibodies was performed. The expression of Synoviolin was found in the hyperplastic synovial tissue and cartilaginous cells formed in the joint areas of toes that exhibited marked swelling.

FIG. 19 indicates diagrams showing the structure of a targeting vector to make the synoviolin gene deficient. The *lacZ* gene is introduced at the translation starting position (ATG codon that is translated into the first methionine; indicated by "") of the mouse synoviolin gene fragment, and a neomycin resistance (neo) gene is introduced as a positive selection marker gene. In addition, the diphtheria toxin A (DT-A) gene is also linked to form a negative selection marker. Individuals in which homologous recombination occurred lack the expression of the synoviolin

gene, but instead,  $\beta$ -galactosidase is expressed and the expression from the promoter of the synoviolin gene can be detected by LacZ staining utilizing its enzyme activity (see FIG. 22). The position of the probe used for Southern blot analysis (see FIG. 20) in order to confirm the genotype is also illustrated.

FIG. 20 indicates a photograph showing the results of analysis of the genotype of a synoviolin gene-deficient mouse. DNA is extracted from tails of about two-week old mouse (wild type and hetero-deficient mouse) and from a 14.5 days post conception (dpc) fetus (homozygously-deficient mouse), and after digestion with *Pst*I, Southern blotting was performed using the probe shown in FIG. 19.

FIG. 21 indicates photographs showing the results of the Northern blot analysis of a synoviolin gene-deficient mouse. mRNA was extracted from a wild type (+/+), synoviolin gene heterozygously knock-out mouse (+/-) and homozygously knock-out mouse (-/-), and Northern blotting was performed using a synoviolin gene fragment as a probe (upper panel). The lower panel illustrates EtBr staining of an agarose gel.

FIG. 22 indicates photographs showing the results of studying the Synoviolin expression location by LacZ staining. The 12.5 days post conception and 13.5 days post conception wild type and heterozygously-deficient mice were stained using LacZ. The expression of Synoviolin in the embryonic stage was found to be strong in the parietal bone, limbs, ears and other locations where bone and cartilage form.

FIG. 23 indicates photographs showing the expression of Synoviolin in the limb-formation stage. The expression of Synoviolin in the limb-formation stage was found to be strong in the apical ectodermal ridge (AER) in the same manner as the expression of FGF4, BMP2 and BMP4.

FIG. 24 indicates photographs showing the LacZ staining of a frozen section of a 13 days post conception limb bud of a heterozygously-deficient mouse. Staining was performed for 4 hours. The blue of LacZ deeply stains undifferentiated mesenchymal cells (anlage of bone and cartilage). Original magnification:  $\times 40$ .

FIG. 25 indicates photographs showing the LacZ staining of a frozen section of a 13 days post conception limb bud of a heterozygously-deficient mouse. Staining was performed for 4 hours. The blue of LacZ deeply stains undifferentiated mesenchymal cells (anlage of bone and cartilage). Original magnification:  $\times 200$ . A, B and C correspond to FIG. 24.

FIG. 26 indicates photographs showing the phenotype of synoviolin gene homozygously-deficient mice at 12.5 days and 13 days post conception. The synoviolin gene homozygously-deficient mice at 12.5 days and 13 days post conception exhibited a trend of a short length from the parietal region to the buttocks, and a trend for the formation of the skull and limbs to be premature. No marked differences in the phenotype were found between the 13 days post conception heterozygously-deficient mouse and wild type mouse.

FIG. 27 indicates photographs showing the phenotype of a 14.5 days post conception synoviolin gene-deficient mouse. Limb bud abnormalities were found in a 14.5 days post conception synoviolin gene homozygously-deficient mouse.

FIG. 28 indicates photographs showing the expression of LacZ in the hind limbs of a 14.5 days post conception synoviolin gene homozygously-deficient mouse (reflecting the expression of Synoviolin). In the abnormal hind limbs of a homozygously-deficient mouse, LacZ was found to be expressed in sites where the AER and undifferentiated mesenchymal cells are concentrated.

FIG. 29 indicates a photograph showing the phenotype of a 15.5 days post conception synoviolin gene-deficient mouse. Limb bud abnormalities and abnormal formation in the upper and lower jawbones and ears were found in a homozygously-deficient mouse. No heartbeat was found and it was not alive.

FIG. 30 indicates photographs showing the skeleton of a 15.5 days post conception synoviolin gene-deficient mouse. Alcian blue and Alizarin red staining are shown. Cartilage stained by Alcian blue and calcified bone stained by Alizarin red were not found in the synoviolin homozygously-deficient mouse.

FIG. 31 indicates photographs showing a mouse arthritis model using an anti-collagen antibody cocktail in a synoviolin knock-out mouse. To the wild type mouse [373 (+/+)] and synoviolin heterozygously knock-out mouse [372 (-/+)], the anti-collagen antibody cocktail was administered to elicit arthritis (+ in the figure). The non-administered wild type mouse (-) was also observed [371 (+/+)]. As a result, swelling and reddening of joints in both the front limbs and hind limbs were lesser in the synoviolin heterozygously knock-out mouse than in the wild type. To wit, the occurrence of arthritis was found to be weaker in the synoviolin heterozygously knock-out mouse than the arthritis elicited in the wild type mouse.

FIG. 32 indicates photographs showing the LacZ staining and Alcian blue staining of primary cultured cells obtained from the limb buds of a synoviolin gene homozygously-deficient mouse (13 dpc fetus). The LacZ positive colony (to wit, the Synoviolin expressing cells) agreed with the Alcian blue stain positive colony. This result suggests that Synoviolin contributes to bone and cartilage differentiation. Passage number 1 (p1).

FIG. 33 indicates photographs showing LacZ staining of a primary cultured cell obtained from the limb bud of a 13 dpc mouse fetus. Cells derived from a wild type mouse (+/+), and synoviolin gene heterozygously (-/+) and homozygously (-/-) deficient mice are shown. The expression of LacZ is observed only in the synoviolin gene-deficient mouse (knock-in of the *lacZ* gene). Passage number 1 (p1).

FIG. 34 indicates photographs showing the LacZ staining and Alcian blue staining of primary cultured cells obtained from the limb buds of a synoviolin gene heterozygously-deficient mouse (13 dpc fetus). The LacZ positive colony (to wit, the Synoviolin expressing cells) agreed with the Alcian blue stain positive colony. Passage number 1 (p1). FIG. 35 indicates photographs showing the LacZ staining and Alcian blue staining of primary cultured cells obtained from the limb buds of a wild type mouse (13 dpc fetus). Staining by LacZ is not observed. Passage number 1 (p1). FIG. 36 indicates a photograph showing the LacZ staining of primary cultured cells obtained from the limb buds of a synoviolin gene heterozygously-deficient mouse (13 dpc fetus). LacZ staining (expression of Synoviolin) is confirmed even in the typical binucleate cartilaginous cells (see the 200 $\times$  image). FIG. 37 indicates photographs showing the von Kossa staining of primary cultured cells obtained from the limb buds of fetal mice. Cells derived from wild type (WT), synoviolin gene heterozygously (Hetero) and homozygously (Homo) deficient mice are shown. A decrease in bone formation capacity is observed in the synoviolin gene-deficient mouse (Homo). Passage number 1 (p1). FIG. 38 indicates photographs showing the LacZ staining of primary cultured cells (passage number 3; p3) obtained from the limb buds of a synoviolin gene homozygously-deficient fetal mouse. The culture was continued until it became subconfluent. After LacZ staining was performed (overnight), hematoxylin eosin (HE) staining was performed. FIG. 39 indicates a diagram showing the results of a  $\beta$ -gal assay of primary cells of a synoviolin gene heterozygously knock-out mouse (*lacZ* gene knock-in). The specimens were measured in triplicate and the mean and standard deviation are indicated. FIG. 40 indicates a diagram showing the results of examining the effects of various drugs on the synoviolin promoter activity by  $\beta$ -gal assay of primary cells of a synoviolin gene heterozygously knock-out mouse (*lacZ* gene knock-in). The specimens were measured in triplicate and the mean and standard deviation are indicated. FIG. 41 indicates a diagram showing the results of ELISA of mouse serum immunized with Syno-P3. Serum obtained from three individuals (Nos. 1-3) was diluted in the indicated ratios and then ELISA was performed. Serum from a non-immunized mouse ("normal" in the diagram) was used as a control. FIG. 42 indicates a diagram showing the results of ELISA of mouse serum immunized with Syno-P2. Serum obtained from three individuals (Nos. 1-3) was diluted in the indicated ratios and then ELISA was performed. Serum from a non-immunized mouse ("normal" in the diagram) was used as a control. FIG. 43 indicates a diagram showing the results of ELISA of mouse serum immunized with Syno-P1. Serum obtained from three individuals (Nos. 1-3) was diluted in the indicated ratios and then ELISA was performed. Serum from a non-immunized mouse ("normal" in the diagram) was used as a control. FIG. 44 indicates photographs showing the results of Western blotting (A) and fluorescent immunostaining (B) of synovial cells derived from RA and OA patients with anti-Synoviolin monoclonal antibodies. FIG. 45 indicates photographs showing the results of immunostaining of synovial tissue derived from RA patients with anti-Synoviolin monoclonal antibodies. The hematoxylin eosin (HE) stain image is also shown. FIG. 46 indicates photographs showing the auto-ubiquitination activity of Synoviolin. FLAG-Synoviolin was reacted in the presence of GST-HA-ubiquitin, ATP, E1 and E2, and the ubiquitination of Synoviolin was detected with Anti-FLAG antibodies and Anti-HA antibodies. CE: cell extract. IP: immune precipitate.

#### Best Mode for Carrying out the Invention

##### [Example 1] Preparation of Anti-Synovial Cell Anti-Serum

**[0137]** Anti-synovial cell anti-serum was obtained using, as an immunogen, synovial cells prepared by the following procedure. Synovial tissue extracted by synovectomy from ten rheumatoid arthritis (RA) patients was washed in phosphate buffered saline (PBS) in a sterile state. The washed tissue was cut to a size of approximately 5 mm square and 0.25% trypsin/PBS digestion was performed at 37°C for 20 minutes. Excess tissue lumps were removed from the digested synovial tissue and the cells thus obtained were suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum (Virology, 8, 396, 1959) (10% FCS-DMEM) and cultured for 24 hours in a sterilized cell culture Petri dish under 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The culture supernatant was discarded, washing was performed using 10% FCS-DMEM, and the non-adhering cells were removed to obtain rheumatism patient-derived synovial cells as cells adhered to the Petri dish (The Journal of Clinical Investigation, 92, 186, 1993). The cultured cells were used as a pool and used in experiments as the following synovial cells derived from RA patients.

**[0138]** Patient-derived synovial cells (1 $\times$ 10<sup>5</sup>) were suspended in 20 mL of 10% FCS-DMEM and cultured in a 76 cm<sup>2</sup> culture flask. The culture medium was changed every 3 days and the culture surface was filled with cells after two weeks, at which time the culture medium was removed and 7 mL each of 0.05% EDTA/PBS and 0.1% trypsin/PBS were added to detach and recover the cells. The recovered cells were washed in PBS to remove the culture medium components, and suspended in 1 mL of PBS to form an immunogen.

[0139] This immunogen was used within 2 hours after preparation to immunize one rabbit by intravenous injection into the ear. Immunization was performed 6 times in total at one-week intervals. At the time of the sixth immunization, when several mL of blood drawn from the ear of the rabbit was tested for anti-serum, it was found by the fluorescent antibody method that the anti-serum reacted with the synovial cells of rheumatism patients. One week after the sixth immunization procedure, a catheter was used to draw as much blood as possible from the heart. This blood was kept overnight at 4°C to coagulate and the serum was separated. As a preservative, 0.1% sodium azide was added to the serum and the serum was stored at 4°C as anti-synovial cell anti-serum.

[Example 2] Gene Cloning of an Antigen (Synoviolin) Recognized by Anti-Synovial Cell Anti-Serum

[0140] The acid guanidine/phenol chloroform method was used to extract the total RNA from the synovial cells of ten RA patients obtained in Example 1, and poly T beads were used to purify the mRNA (Analytical Biochemistry, 162, 159, 1987). The λZAP vector (Stratagene) was used to prepare a cDNA library of RA patient synovial cells by the ordinary method. A picoBlue immunoscreening kit (Stratagene) was used to perform immunoscreening with the anti-synovial cell anti-serum of Example 1 above (FIG. 1). The positive clone (phage) thus obtained was converted to a plasmid pBluescript II SK (+) with a helper phage. The nucleotide sequence of the DNA inserted into the pBluescript II SK (+) was determined with an ABI PRISM 377 DNA Sequencer (PERKIN ELMER) using M13PrimerM4 and M13PrimerRV (Takara) based on the dye terminator method (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 5463, 1977). The nucleotide sequence was determined from the 3' end of the gene (named "synoviolin") that encodes the antigen recognized by the above anti-synovial cell anti-serum, and a 2990 bp nucleotide sequence including a poly(A)<sup>+</sup> chain was clarified (SEQ ID NO: 1, No. 42-3031). Using this nucleotide sequence, a 3031 bp nucleotide sequence including the coding region of full-length synoviolin, a portion of the 5'-non-coding region and a poly(A)<sup>+</sup> chain (SEQ ID NO: 1) was determined from the synovial cell cDNA library by the 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) method (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85:8998-9002, 1988). As a result of performing a homology search in GenBank, this nucleotide sequence was found to be a new gene, with no similar sequence being reported.

[Example 3] Expression of Partial Synoviolin Recombinant Protein in *E. coli*

[0141] From a cDNA clone obtained by immunoscreening using anti-synovial cell anti-serum, cDNA that encodes a portion of Synoviolin (1799 bp; SEQ ID NO: 1, No. 1233-3031) was treated with the restriction enzymes *EcoRI* and *XhoI* and extracted. The cDNA which has a sequence recognized by *EcoRI/XhoI* at its ends was inserted into the glutathione S-transferase (GST) fusion protein expression vector pGEX-5X-3 and subcloning was performed. pGEX-5X-3 into which a portion of the synoviolin cDNA was inserted was introduced into the BL21 *E. coli* strain by 45-second heat shock at 42°C to obtain BL21/synoviolin-GST gene/pGEX-5X-3. This BL21 was cultured in an LB medium containing 0.1 mg/mL ampicillin, 0.1 mM isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) was added, and it was cultured for an additional 2 hours at 37°C to induce the expression of the aforementioned fusion protein. After the BL21 recovered by centrifugation was washed in PBS, the BL21 was digested with 1 mg/mL lysozyme and solubilized with 0.1% Triton X-100. The BL21-derived protein suspension containing solubilized GST fusion protein was applied to Glutathione Sepharose 4B (GS4B) and then washed with PBS, and 50 mM reduced form of glutathione/PBS was used to purify the desired GST-partial Synoviolin fusion protein.

[Example 4] Expression of Full-Length Synoviolin Recombinant Protein in *E. coli*

[0142] Synoviolin cDNA (syno-HAHA) comprising the cDNA (1851 bp; SEQ ID NO: 1, No. 60-1910) that encodes Synoviolin obtained in Example 2 to which two molecules of an influenza hemagglutinin (HA)-tag were added at the 3'-end was inserted into the glutathione S-transferase (GST) fusion protein expression vector pGEX-5X-1 and subcloning was performed. pGEX-5X-1 into which the syno-HAHA gene was inserted was introduced into the BL21 *E. coli* strain by 45-second heat shock at 42°C to obtain BL21/syno-HAHA/pGEX-5X-1. This BL21 was cultured in an LB medium containing 0.1 mg/mL ampicillin, 0.1 mM isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) was added, and it was cultured for an additional 3 hours at 30°C to induce the expression of the Synoviolin protein with GST fused to the N terminus and HA fused to the C terminus (GST-Synoviolin-HAHA). After the BL21 recovered by centrifugation was washed in PBS, the BL21 was digested with 1 mg/mL lysozyme and solubilized with 0.1% Triton X-100. The BL21-derived protein suspension containing solubilized GST-Synoviolin-HAHA protein was applied to Glutathione Sepharose 4B (GS4B) and then washed with PBS, and 50 mM reduced form of glutathione/Tris-HCl (pH 8.0) was used to purify the desired GST-Synoviolin-HAHA protein.

[0143] Confirmation of expression was performed by 200 times and 2000 times diluting the fractions eluted with 50 mM reduced form of glutathione, by treating them with 25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.05% mercaptoethanol and 0.1% glycerol, and then by applying them to 8% SDS polyacrylamide electrophoresis

(SDS-PAGE). After SDS-PAGE, GST-Synoviolin-HAHA protein was transferred to a nylon membrane by electroblotting. This nylon membrane underwent blocking for 60 minutes at room temperature in PBS containing 5% skim milk, and then underwent immune reaction for 60 minutes at room temperature with anti-HA monoclonal antibodies (Boehringer Mannheim) diluted 400 times with PBS containing 0.5% skim milk. After the reaction, it was washed with 0.1% Tween 20/PBS, subjected to an immune reaction for 60 minutes at room temperature with horseradish peroxidase (HRP) labeled mouse IgG antibodies as the secondary antibodies, and washed with 0.1% Tween 20/PBS, and the target antigen was detected by detecting HRP activity. The detection of HRP activity was performed using an ECL kit (Amersham) (Clinical Chemistry, 25, p. 1531, 1979). The results are shown in FIG. 2. From the molecular weight size of the aforementioned GST-Synoviolin-HAHA fusion protein, the molecular weight of the Synoviolin protein is estimated to be approximately 80 kDa.

#### [Example 5] *In Vitro* Expression of Full-Length Synoviolin Recombinant Protein

[0144] The end of the synoviolin gene (SEQ ID NO: 1) was modified with the restriction enzyme *EcoRI* and inserted into the pBluescript II KS vector (syno/pBluescript). Thereafter, syno/pBluescript (1 µg) and TNT-coupled Translation System (Promega) were used with *in vitro* translation to express the Synoviolin protein *in vitro* as an [<sup>35</sup>S]-labeled protein. The [<sup>35</sup>S]-labeled Synoviolin protein was applied to 10% SDS-PAGE and its radioactivity was detected with an image analyzer (BAS2000, Fujix). The results are shown in FIG. 3. The molecular weight according to SDS-PAGE of the Synoviolin protein translated *in vitro* from the synoviolin gene was found to be approximately 80 kDa.

#### [Example 6] Confirmation of Expression of the Synoviolin Gene by Northern Blotting

[0145] mRNA was obtained by ordinary methods from RA patient-derived synovial cells obtained in Example 1, the A549 cell line, Jurkat cell line and the HeLa cell line. 1 µg of this mRNA was separated by 1% agarose gel electrophoresis and transferred to a nylon membrane by contact blotting. The nylon membrane was treated for 2 hours at 80°C, and prehybridization was performed for 2 hours at 42°C in Denhardt's solution. Next, using <sup>32</sup>P radiolabeled synoviolin cDNA (1799 bp; SEQ ID NO: 1, No. 1233-3031) as a probe, hybridization was performed for 12 hours at 42°C. After the reaction, the nylon membrane was washed in 300 mM NaCl and 30 mM sodium citrate, and then 15 mM NaCl and 1.5 mM sodium citrate were used to perform washing again at 50°C. The desired mRNA was detected by exposure to X-ray film. The autoradiograph obtained as a result is shown in FIG. 4. The synoviolin gene was found to be expressed strongly in RA patient-derived synovial cells.

#### [Example 7] Confirmation of Expression of Synoviolin in Various Cells by Western Blotting

[0146] The state of expression of Synoviolin was confirmed by Western blotting using the following cells as specimens.

- RA patient-derived synovial cells prepared in Example 1
- Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)
- HEK (human embryonic kidney) -293T
- GST-partial Synoviolin fusion protein prepared in Example 3 (positive control)

[0147] First, the various cells used as specimens were solubilized in 1% NP-40 to prepare cell lysates. Each of the cell lysates was treated with 25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.05% mercaptoethanol and 0.1% glycerol, and then separated with 8% SDS polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE). After SDS-PAGE, protein derived from the various cells was transferred to a nitrocellulose (NC) membrane by electroblotting. On this NC membrane, anti-synovial cell anti-serum was diluted 1000 times with Tris buffered saline (TBS) containing 2.0 mg/mL GST-partial Synoviolin fusion protein and 5% skim milk, and subjected to immune reaction for 60 minutes at room temperature. In addition, as negative controls, an experiment wherein the same antibody solution is reacted with the NC membrane, and an experiment wherein the GST-partial Synoviolin fusion protein in the antibody solution is replaced with GST alone were performed at the same time. After the reaction, the NC membrane was washed with 0.1% Tween 20/TBS, subjected to an immune reaction for 60 minutes at room temperature with horseradish peroxidase (HRP) labeled anti-rabbit IgG antibodies as the secondary antibodies, and washed with 0.1% Tween 20/TBS, and the target antigen was detected by detecting HRP activity. The detection of HRP activity was performed using an ECL kit (Amersham) (Clinical Chemistry, 25, p. 1531, 1979). The results are shown in FIG. 5.

[0148] GST-partial Synoviolin blocked the immune reaction of the anti-synovial cell anti-serum to the 220 kDa protein that was detected in RA patient-derived synovial cells in the control experiments (FIG. 5; +GST), and not detected in the HUVEC and HEK-293T cells, and partially blocked its immune reaction to the approximately 140 kDa protein and

approximately 185 kDa protein (FIG. 5; +GST-partial Synoviolin).

[0149] The reactivity observed in bands other than 220-kDa band is presumed to be fibronectin (molecular weight: approximately 240 kDa) or subunits of laminin (molecular weight: approximately 200 kDa) determined by their reactivity to other antibodies. Based on the results of these experiments, the molecular weight of Synoviolin is presumed to be approximately 220 kDa. However, the molecular weight of Synoviolin as confirmed in Example 5 is approximately 80 kDa. From the difference between the two, it is conceivable that Synoviolin has a multimeric structure that is not dissociated in SDS.

#### [Example 8] Confirmation of Expression of Synoviolin Protein in RA Patient-Derived Synovial Cells by Western Blotting

[0150] The RA patient-derived synovial cells prepared in Example 1 were solubilized in 1% NP-40 to prepare cell extract fractions. This synovial cell extract was treated with 25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.05% mercaptoethanol and 0.1% glycerol, and then separated by 8% SDS polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE). After SDS-PAGE, the synovial cell-derived protein was transferred to a nitrocellulose (NC) membrane by electroblotting. On this NC membrane, anti-synovial cell anti-serum (in the figure, after immunization) obtained by immunizing RA patient-derived synovial cells was diluted 1000 times with Tris buffered saline (TBS) containing 5% skim milk, allowed to undergo blocking for 1 hour at room temperature with Tris buffered saline (TBS) containing 5% skim milk and subjected to immune reaction for 1 hour at room temperature. At the same time, serum drawn from a rabbit prior to the immunization of the rabbit with synovial cells (pre-immune) was used as a negative control. After reaction, the NC membrane was washed with 0.1% Tween 20/TBS, subjected to an immune reaction for 1 hour at room temperature with horseradish peroxidase (HRP) labeled anti-rabbit IgG antibodies as the secondary antibodies, and washed with 0.1% Tween 20/TBS, and the target antigen was detected by detecting HRP activity. The detection of HRP activity was performed using an ECL kit (Amersham) (Clinical Chemistry, 25, p. 1531, 1979). The results are shown in FIG. 6.

#### [Example 9] Confirmation of Expression of Synoviolin in Various Cells and Synovial Tissue by Immunostaining

[0151] Immunostaining was performed by fixing synovial cells upon glass slides by the ordinary method, and immunostaining was performed using the anti-synovial cell anti-serum of Example 1. A sample subjected to 30-minute blocking with 1% bovine serum albumin (BSA) was allowed to undergo immune reaction for 60 minutes at room temperature with anti-synovial cell anti-serum diluted 100 times with 1% BSA. In addition, along with observation with anti-serum, experiments were also performed using anti-synovial cell antibodies purified from this anti-serum. Purified anti-synovial cell antibodies were prepared by immunoaffinity purification using GST-partial Synoviolin fusion protein as a ligand. The ligand used was a fusion protein expressed after the GST-fusion protein expression vector pGEX-5X-3 containing the 1799 bp synoviolin gene up to No. 1233-3031 of SEQ ID NO: 1 was transformed into BL21. A Glutathione Sepharose column was produced by the method of the Pharmacia Corp, to prepare a GST-partial syno-GS column. As a control for the case where purified anti-synovial cell antibodies were used, an anti-GST antibody obtained by the immunoaffinity purification of anti-serum in the same manner where GST was used as the ligand was used.

[0152] After reaction, the sample was washed with PBS and then allowed to undergo immune reaction using fluorescein isothiocyanate-labeled anti-rabbit IgG antibodies as the secondary antibody. Confirmation of the antigen in the immune reaction with anti-synovial cell anti-serum was performed with a confocal laser microscope. The results are shown in FIG. 7. This anti-serum exhibited a strong immune reaction with RA patient-derived synovial cells, and it was confirmed that this immune reaction was blocked by the GST-partial Synoviolin fusion protein prepared in Example 3 (FIG. 7, top). Moreover, it was confirmed that the immune reaction became even stronger and positive for purified anti-synovial cell antibodies prepared from this anti-serum (FIG. 7, bottom).

[0153] The staining of RA patient-derived synovial tissue was performed by fixing synovial tissue upon glass slides by the ordinary method. A sample subjected to 30-minute blocking with 1% BSA was allowed to undergo immune reaction for 60 minutes at room temperature with anti-synovial cell anti-serum diluted 100 times with 1% BSA. After reaction, the sample was washed with PBS and then allowed to undergo immune reaction using HRP-labeled anti-rabbit IgG antibodies as the secondary antibody. Confirmation of the antigen in the immune reaction with anti-synovial cell anti-serum was performed by the coloring of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride based on HRP activity. In the same manner as in the aforementioned Western blotting, GST-partial Synoviolin fusion protein was used to perform an anti-synovial cell anti-serum absorption test with respect to synovial tissue staining. Tissue staining was performed by adding 2.0 mg/mL of GST-partial Synoviolin fusion protein or GST (2.0 mg/mL) to anti-synovial cell anti-serum. The results are shown in FIG. 8. The staining of synovial tissue with anti-synovial cell anti-serum seen in the control was found to be weakened by GST-partial Synoviolin fusion protein (FIG. 8). In addition, the immunostaining of synovial tissue using the aforementioned purified antibodies from GST-partial Syno-GS was found to react positively in comparison to the antibodies obtained from GST-GS (FIG. 9).



[0154] Based on the results of Western blotting (Example 8) and immunostaining, it was confirmed that the Synoviolin protein recognized by anti-synovial cell anti-serum was expressed in RA patient-derived synovial cells and synovial tissue.

[Example 10] Presence of Anti-Synoviolin Antibodies in Serum of RA Patients

[0155] The present inventors attempted to detect anti-Synoviolin antibodies in the serum of RA patients by Western blotting using GST-partial Synoviolin fusion protein as the antigen. Using the same procedure as in Example 7, first, GST-partial Synoviolin fusion protein (100 ng/lane) was electrophoresed by SDS-PAGE and transferred to an NC membrane. As the primary antibodies, RA patient serum (5 cases) was diluted 1000 times with Tris buffered saline (TBS), and allowed to undergo immune reaction for 60 minutes at room temperature with the NC membrane onto which GST-partial Synoviolin fusion protein was transferred. The NC membrane was washed with 0.1% Tween 20/TBS, subjected to an immune reaction for 60 minutes at room temperature with HRP-labeled anti-human IgG antibodies as the secondary antibodies, and washed with 0.1% Tween 20/TBS, and the human IgG that reacted with the target antigen was detected by detecting HRP activity. The detection of HRP activity was performed in the same manner as in Example 7. The results are shown in FIG. 10. Anti-IgG antibodies against GST-partial Synoviolin fusion protein was found in the serum of RA-patients (five of five) (FIG. 10). On the other hand, antibodies that recognize GST-partial Synoviolin were not found in serum derived from osteoarthritis (OA) patients and normal human serum.

[Example 11] Identification of Synoviolin Ligand by Screening an Expression Library

[0156] Screening for the Synoviolin ligand was performed using the cDNA expression library derived from RA patient synovial cells prepared in Example 2 (Tadaomi Takenawa, Toshiki Watanabe, eds., *Baiomanyuaru UP Shirizu "Tam-pakushitsu no Bunshikan Sogosayo Jikken Ho"* [Bio-Manual UP Series "Protein Intermolecular Interaction Experimental Method"], pp. 66-67, Yodosha Co., Ltd.; Kaelin, W. G. et al., Cell 70, 351-364, 1992; Skolnik, E. Y. et al., Cell 65, 83-90, 1991; Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, a laboratory manual second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 12.16-12.20, 1989). The library phage was inoculated into *E. coli* (XL1-Blue MRF') by incubation for 20 minutes at 37°C, and spread upon a plate after mixing with Top agarose. After culturing for 3.5 hours at 42°C, a nitrocellulose membrane soaked in 10 mM IPTG and dried was placed upon a plate and culturing was performed for an additional 3.5 hours at 37°C. After the membrane was recovered, it was washed five times for 5 minutes in a washing buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% skim milk, 0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, protease inhibitor (complete, Boehringer Mannheim)] and soaked for 1 hour in a blocking buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5% skim milk, 0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 5% glycerol, protease inhibitor (complete, Boehringer Mannheim)]. After 5-minute washing was performed five times with the washing buffer, incubation was performed after adding, as a probe (approximately 10<sup>6</sup> cpm/ml), GST-Synoviolin (the GST-partial Synoviolin fusion protein purified in Example 3) that was <sup>32</sup>P-labeled with protein kinase A. Washing was performed repeatedly while changing the washing buffer until the count per membrane became approximately 1 kcpm, and then the signal was detected by autoradiography. As a result, a clone bound to Synoviolin was obtained. This clone was named Synoviolin ligand (SL).

[0157] Regarding the cDNA of SL, the nucleotide sequence was determined for 100 bp near its 5' end and 100 bp near its 3' end. Upon performing a database search based on the nucleotide sequence information thus obtained, the sequence in the 100 bp portion at the ends was found to be the same as that of a known gene called S1-5 [Lecka-Czernik, B. et al., Molecular and Cellular Biology, 15, 120-128, 1995; accession number U03877 (cDNA), AAA65590 (protein), also called "EFEMP1": Stone, E. M. et al., Nature Genetics 22, 199-202, 1999; accession number Q12805 (protein)]. The sizes of both genes are roughly the same, and the sizes of their translation products are roughly the same, suggesting that they are the same protein.

[Example 12] Expression of the SL Gene by Northern Blotting

[0158] mRNA was extracted from various cells in the same manner as in Example 6, and Northern blotting was performed using the SL cDNA obtained in Example 11 as a probe. The cells used are those given below. The RA patient-derived synovial cells were found to exhibit overexpression of the SL gene (FIG. 11).

HEK-293T

RA patient-derived synovial cells prepared in Example 1

A549

HeLa



## [Example 13] Binding of Synoviolin to SL

[0159] The SL cDNA was inserted into a pGEX vector in the same manner as in Example 3 to prepare GST-SL fusion protein, and the GST-SL (500 ng) was applied to 10% SDS-PAGE along with GST (1  $\mu$ g) as a control. After SDS-PAGE, it was transferred to a nylon membrane by electroblotting. This nylon membrane was denatured for 1 hour at room temperature with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 6M guanidine hydrochloride and 5 mM 2-mercaptoethanol, and regenerated overnight at 4°C in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 5 mM 2-mercaptoethanol and 0.05% Tween 20. The regenerated nylon membrane was treated with blocking buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5% skim milk, 0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 5% glycerol, protease inhibitor (complete, Boehringer Mannheim)] and washed in blocking buffer (same as above, except for 0.5% skim milk). Thereafter, the TNT-coupled Translation System (Promega) and pcDNA3-HA-synoviolin-HAHA (SEQ ID NO: 1 synoviolin cDNA 1851 bp; synoviolin cDNA with an HA-tag added at 60-1910 inserted into the expression vector pcDNA3) were used to perform *in vitro* translation, [<sup>35</sup>S]-labeled HA-Synoviolin-HAHA fusion protein ([<sup>35</sup>S]HA-Synoviolin-HAHA) was used as a probe, and the GST-SL and GST upon the nylon membrane were allowed to react for 2 hours at room temperature. This nylon membrane was washed in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% skim milk, 0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, and protease inhibitor (complete, Boehringer Mannheim), and its radioactivity was detected with an image analyzer (BAS2000, Fujix). Binding between the GST-SL fusion protein and [<sup>35</sup>S]HA-Synoviolin-HAHA transferred to the nylon membrane was observed. In addition, binding was not observed in the control of GST and [<sup>35</sup>S]HA-Synoviolin-HAHA (FIG. 12). From these results, Synoviolin and SL are presumed to bind by protein interaction.

[0160] In addition, in Example 14, results are obtained that suggest that hyperplasia of synovial cells is blocked through Synoviolin-based neutralization of Synoviolin ligand in a culture. Based on these results, mutants of SL that have a structure corresponding to the Synoviolin binding sites of SL are thought to possibly have the action of suppressing the hyperplasia of synovial cells by antagonistic blocking action on the binding of Synoviolin to SL. Moreover, Synoviolin mutants that have a structure corresponding to the SL binding sites of Synoviolin are also expected to have antagonistic blocking action in the same manner as SL mutants.

## [Example 14] MTT Assay

[0161] The RA patient-derived synovial cells prepared in Example 1 were used to prepare 96 well plates so that there were 5x10<sup>3</sup> cells/well, and GST or GST-partial Synoviolin was added to the cell supernatant so that the final concentration became 0.01 to 1  $\mu$ M. After three days of culture, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)/PBS was added to the cell supernatant, and it was cultured for 3 hours under conditions of 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After culturing, the cell supernatant was removed, crystals of MTT formazan were dissolved with dimethyl sulfoxide, and absorbance measurement was performed (Journal of Immunological Methods, 65, 55, 1983). Under conditions of 10%-FCS/DMEM, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, the RA patient-derived synovial cell hyperplasia was significantly suppressed by GST-partial Synoviolin (1  $\mu$ M) (FIG. 13).

## [Example 15] Preparation of a Synoviolin Gene-Introduced Mouse

[0162] A vector for expressing the synoviolin gene was constructed by linking a Flag tag to the N terminus of the DNA that encodes the Synoviolin protein and linking a poly(A) signal downstream of the 3' side. The vector is constructed based on pCAGGS (Niwa, H. et al., Gene 108: 193-9, 1991) with a  $\beta$ -actin promoter as the promoter, and with human cytomegalovirus immediate early enhancer as the enhancer (FIG. 14).

[0163] The vector for expressing the synoviolin gene was injected into a mouse egg cell by microinjection using a microscopic glass pipette connected to a manipulator under a microscope. DNA was injected into the male pronucleus of a fertilized egg and the injected manipulated egg was transferred to the fallopian tubes of a female mouse (recipient mouse) in which false pregnancy was induced by breeding with a vasectomized male mouse. Mouse pups were obtained through natural parturition or cesarean section 19 days after transfer. In the case of a cesarean section, the mouse pups were nursed by a separately prepared female mouse as a foster mother. DNA was taken from each tail of the newborn mice and PCR was used to confirm that it carries the transgene.

[0164] As a result, marked swelling of the joints was observed in Synoviolin overexpression mice. The rate of onset of arthropathy in synoviolin gene-expressed mice was found to be 33% (10 out of 30 individuals). Accordingly, the swelling of joints is thought to be not a natural-onset mouse deformation (the rate of onset of hydrocephaly in the C57B6 mouse is less than 1%) but rather due to the contribution of the Synoviolin molecule. A photograph taken by soft X-ray photography of the left hind limb of a Synoviolin overexpression mouse is shown (FIG. 15).

## [Example 16] Histological Study of Joints

[0165] The present inventors performed a histological study of the toe joints of a synoviolin gene-expressed mouse (1 individual). Hematoxylin eosin (HE) staining of tissue sections of toe joint portions was performed. The hematoxylin eosin staining was performed according to known methods.

[0166] As a result of HE staining, bone disruption accompanying marked synovial hyperplasia and abnormal bone formation were found in portions that exhibited arthropathy (FIG. 16). On the other hand, the aforementioned findings were not observed in the normal toe joints of gene-expressed mice used as a control (FIG. 17, top).

[0167] In addition, as a result of performing immunostaining with anti-Flag antibodies in the toe joints, the expression of Synoviolin was found in the synovial tissues and cartilaginous cells that exhibited hyperplasia in synoviolin gene-expressed mice (FIG. 18), but the aforementioned findings were not observed in the normal toe joints of gene-expressed mice (FIG. 17, bottom).

## [Example 17] Preparation of a Knock-Out Mouse

[0168] The *lacZ* gene was inserted in the translation starting position of the mouse synoviolin gene fragment (ATG codon that is translated into the first methionine) to construct a targeting vector. As the marker gene, a neomycin resistance (neo) gene was inserted and the diphtheria toxin A (DT-A) gene was also linked to be able to exclude cell lines wherein non-homologous recombination occurs (FIG. 19).

[0169] This targeting vector was transferred into a mouse ES cell TT-2 by electroporation, and cell lines in which homologous recombination occurred were selected. The cells thus obtained were injected into a mouse blastocyst or eight-cell stage embryo and either directly transplanted to the fallopian tubes of a surrogate mother or transplanted to the uterus of a surrogate mother after being cultured for one day to develop into a blastocyst. Thereafter, a knock-out mouse was prepared by the same method as in the preparation of a transgenic animal. The heterozygously mutated mice (F1) thus obtained were bred to each other to obtain heterozygously and homozygously mutated mice. In the mutated mice thus obtained, the LacZ protein ( $\beta$ -galactosidase) is expressed instead of Synoviolin in tissues where Synoviolin should be expressed.

[0170] The genotype was confirmed by Southern blot analysis. Regarding the wild type mice (14 individuals) and synoviolin heterozygously knock-out mice (32 individuals), DNA was extracted from a point roughly 3 mm from the tip of the tail of the mouse at age of about 2 weeks after birth. With the synoviolin homozygously knock-out mice, samples were taken under a stereomicroscope from the tail and upper and lower limbs of 14.5 days post conception mice, and DNA was extracted. The DNA thus obtained was subjected to digestion of the DNA with the restriction enzyme *Pst*I and was used. The results of analysis are shown in FIG. 20. Bands were detected at 6.5 kbp in the wild type, at 8.5 kbp in the homozygously mutated mice, and at both positions in the heterozygously mutated mice.

[0171] The expression of the synoviolin gene was confirmed by Northern blotting. mRNA was extracted from wild type, heterozygously knock-out mouse and homozygously knock-out mouse individuals (whole embryo at 12.5 days post conception), and electrophoresis was performed with 20  $\mu$ g in each lane of 1.2% agarose gel. As a result, synoviolin mRNA was not detected in homozygously knock-out mouse (-/-) individuals, while the expression of mRNA in heterozygously knock-out mouse (+/-) individuals was observed to be weaker than that of wild type (+/+) individuals (FIG. 21).

## [Example 18] Study of Synoviolin Expression Sites

[0172] The present inventors used LacZ staining to study the Synoviolin expression sites in the mutated mouse individuals obtained in Example 17. To wit, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-Gal) was used to color the entire embryo and examine the distribution of expression of LacZ (as  $\beta$ -galactosidase activity). The number of embryos observed was 32.

[0173] As a result, strong expression of LacZ was found in the parietal bone and limbs at 12.5 days post conception, and in the ears and limbs at 13.5 days post conception (FIG. 22). All of these were sites where bone or cartilage is formed. Moreover, as a result of performing LacZ staining and HE staining of limb tissue sections during the limb formation stage, strong expression was observed in the apical ectodermal ridge (AER) and the anlage of cartilage and bone (or cartilage and bone) (FIG. 23).

[0174] Moreover, 13-day post conception limb buds were excised and frozen sections were prepared. Then, hematoxylin eosin (HE) or LacZ staining was performed. Specifically, the frozen sections were washed three times for 5 minutes in PBS (-), and glass slides carrying the sections were soaked in X-gal staining solution [X-gal (20 mg/ml) 1.25 ml, HEPES (1M) 2.2 ml, potassium ferricyanide solution (100 mM) 1.5 ml, NaCl (5M) 150  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (1M) 65  $\mu$ l, 10 $\times$ PBS (-) 5 ml to which milli-Q water (Millipore) was added to reach 50 ml], thereby starting the reaction at 37°C. After staining, dehydration was performed by an ethanol series and xylene and sealing was performed. As a result, the staining of the LacZ blue color was deep in the undifferentiated mesenchymal cells (the anlage of bone and cartilage) (FIGS. 24

and 25).

[Example 19] Study of Phenotypes

[0175] Moreover, the present inventors studied the phenotypes of the synoviolin gene knock-out mouse.

[0176] At 12.5 days post conception, the homozygotes exhibited a trend of a shorter length from the parietal region to the buttocks than that of the heterozygotes, and a trend for the formation of the skull and limbs to be premature, but at 13 days post conception, there was no marked difference in the phenotype between the heterozygotes and wild types (FIG. 26). Besides, no births of homozygous mouse individuals were found, and no live homozygous mouse embryos were found after at least 17 days post conception., Accordingly, these were thought to be fetal deaths (Table 1).

Table 1

Age	Number analyzed	Wild type	Heterozygote	Homozygote (alive or dead)
12.5 dpc	10	0	8	2 (alive)
13 dpc	10	2	7	1 (alive)
14.5 dpc	6	2	3	1 (?)
15.5 dpc	6	0	5	1 (dead)
4 weeks old	46	14	32	0

[0177] At 14.5 days post conception, no marked difference was observed between heterozygotes and homozygotes in the length from the parietal region to the buttocks. However, while the toes and joints were formed in the heterozygotes, they were not formed in the homozygotes and limb abnormalities were found (FIG. 27).

[0178] Moreover, as a result of performing LacZ and HE staining on the hind limbs that exhibited abnormalities in the homozygotes, the expression of LacZ which reflects the expression of Synoviolin was found in the concentrated sites of the AER and undifferentiated mesenchymal cells (locations of future toe bone formation) (FIG. 28).

[0179] At 15.5 days post conception, the homozygotes were dead, exhibiting morphological abnormalities in the limb buds, upper and lower jaws and ears (FIG. 29). Moreover, cartilaginous tissue was stained by Alcian blue and bone (calcified) tissue was stained by Alizarin red. To wit, the epidermis, dermis and contents of a mouse were removed, soaked in fixer (ethanol:hydrogen peroxide = 9:1), dehydrated in an alcohol series, and then stained with Alizarin red and Alcian blue, and the tissue was made transparent with an alkaline solution. After made transparent, it was kept in a glycerin solution and staining was observed. As a result, no formation of cartilaginous tissue (stained blue) or bone (calcified) tissue (stained red) was found in the homozygote (FIG. 30).

[0180] From the aforementioned results, the synoviolin gene homozygously knock-out mouse was found to exhibit developmental abnormalities in its limb buds in the fetal stage. In addition, the formation of cartilage and bone was not found, and Synoviolin was found to be expressed in the locations of development of the limb buds, cartilage and bone. Accordingly, the contribution of the Synoviolin molecule to skeletal formation is strongly conceivable.

[Example 20] Administration of Cocktail for Arthritis to the Synoviolin Gene Knock-Out Mouse

[0181] Collagen-induced arthritis (CIA) in the mouse is widely used as an arthritis model for human rheumatoid arthritis. An anti-collagen antibody cocktail was administered to the synoviolin gene knock-out mouse (heterozygote) prepared in Example 17 and to a wild-type mouse, and the arthritis elicited was observed. As a result, the elicitation of arthritis in the synoviolin heterozygously knock-out mouse was found to be weaker than that of the wild type (FIG. 31). These results also support the fact that Synoviolin contributes to the induction of arthritis in RA.

[Example 21] Analysis of a Primary Culture of Fetal Limb Bud Cells of a Synoviolin Gene Knock-Out Mouse

[0182] Among the cells obtained (by the explant method) from a knock-out (KO) mouse, LacZ staining, namely the expression of Synoviolin, was found only in the undifferentiated mesenchymal cells thought to be the anlage of cartilage, bone and limbs. In addition, in the primary culture of fetal limb bud cells, the LacZ positive colony (to wit, the Synoviolin expressing cells) agreed with the Alcian blue stain-positive colony, and moreover, the staining of LacZ (as  $\beta$ -galactosidase activity) (expression of Synoviolin) is observed in the typical binucleate cartilaginous cells also. This supports the fact that Synoviolin is involved in bone and cartilage differentiation. Moreover, by alkaline phosphatase staining, von Kossa staining or other methods, it was confirmed that the capacity to form bone and cartilage was delayed in homozygously knock-out derived cells (FIGS. 32-38).

[0183] In van Kossa staining, after the cells were washed, the solution was substituted with silver nitrate solution

(5% w/v). After the cells were lightly washed with distilled water, reduction and fixing were performed with sodium thiosulfate solution (5% w/v). After washing, counterstaining was performed with *Kernechtrot* solution (0.1% w/v *Kernechtrot* (Nuclear Fast Red), 5% w/v aluminum sulfate) (Masaji Seki, *Soshiki Kensa Ho -Soshiki Kozo to Kyokusho Kagaku*-[Tissue Test Methods: Tissue Structure and Local Chemistry], 257-258, Kyorin-Shoin, 1961; L. Lison, Tadashi Imaizumi, trans., *Histochimie et Cytochimie Animales: Principes et Méthodes* [Animal Histochemistry and Cytochemistry: Principles and Methods], 625-636, Hakusuisha Publishing Co. Ltd., 1962; Yutaka Sano, *Soshikikagaku Kenkyu Ho - Riron to Jutsushiki* [Histochemistry Research Methods: Theory and Practice], 616-621, Nanzando Co., Ltd., 1965). The detection of alkaline phosphatase activity was performed with an alkaline phosphatase tissue staining kit (Sigma, Diagnostic Kits and Reagents, alkaline phosphatase (AP), leukocyte, Cat. No. 86-R).

#### [Example 22] Test Compound Assay Using Synoviolin Gene Knock-Out Mouse-Derived Cells

**[0184]** Primary cultured cells of a synoviolin gene heterozygously knock-out mouse (*lacZ* gene knock-in) were used to evaluate the effect of a test specimen on the expression of the synoviolin gene by  $\beta$ -gal assay. The primary cultured cells of a synoviolin gene heterozygously knock-out mouse after 3 passages were seeded to 24 well plates at  $0, 1 \times 10^3, 3 \times 10^3, 1 \times 10^4, 3 \times 10^4$  and  $1 \times 10^5$  cells per well, and cultured overnight in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum. First, cell lysis solution (Promega) was added to the cell culture in the absence of stimulation in a quantity (100  $\mu$ l/well) sufficient to cover the cell layers completely. Then, the culture plates were moved to a shaking machine and shaken gently for 15 minutes at room temperature so that the cell layers were always soaked in lysis solution.

**[0185]** The  $\beta$ -galactosidase activity of the cells was measured in the following manner. To 20  $\mu$ l of the obtained cell extract solution were added 1  $\mu$ l of Mg solution (0.1M  $MgCl_2$ , 4.5M  $\beta$ -mercaptoethanol), 22  $\mu$ l of ONPG solution (o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) (concentration of 4 mg/ml in a 0.1M phosphate buffer (pH 7.5)), and 57  $\mu$ l of 0.1M phosphate buffer (pH 7.5), to give a total volume of 100  $\mu$ l. With care not to allow it to dry, incubation was performed for 6 hours at 37°C. The reaction was halted by adding 150  $\mu$ l of 1M sodium carbonate solution (prepared by dissolving 21.2 g of  $Na_2CO_3$  in  $H_2O$ , by adjusting to 200 ml and by filtering with a 0.45  $\mu$ m filter), and the  $\beta$ -galactosidase activity was quantified by measuring the absorbance at 420 nm. The experiment was performed in triplicate. As a result,  $\beta$ -galactosidase activity was detected in the *lacZ* gene knock-in mouse cells depending on the number of cells (FIG. 39). The present inventors confirmed that the evaluation of promoter activity ( $\beta$ -gal assay) is possible using  $\beta$ -galactosidase activity as an index.

**[0186]** Next,  $\beta$ -gal assay was performed in the same manner by adding various drugs to the primary cultured cells, and then the effects of the various drugs on synoviolin promoter activity were evaluated. As a negative control, the same measurements were performed by adding the culture medium only. The test drugs used were prednisolone (0.01-1  $\mu$ M) and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA; 0.001-0.1  $\mu$ M). Prednisolone is a steroidal anti-inflammatory drug, and TPA is a protein kinase C activator.

**[0187]**  $5 \times 10^4$  primary culture cells were seeded in each well, and after culturing overnight, the various drugs were added at the aforementioned concentrations. After the drugs were added, the cells were cultured for 72 hours and the  $\beta$ -galactosidase activity of each well was measured to evaluate the promoter activity. As a result, the synoviolin promoter activity was found to be affected by these drugs in a concentration-dependent manner (FIG. 40). To wit, this confirmed that the activity of the drug on the synoviolin promoter could be evaluated with the assay system based on the present invention. From the results above, such an assay can be used to evaluate the effect of various drugs on the synoviolin promoter activity, and thus, it is possible to screen for compounds that promote or suppress the synoviolin promoter activity.

#### [Example 23] Preparation of Anti-Synoviolin Monoclonal Antibodies

**[0188]** Monoclonal antibodies to Synoviolin were prepared as follows. As peptides used for immunization, the following three peptides containing partial amino acid sequences of human Synoviolin were synthesized. These amino acid sequences were selected from among the domains assumed to have antigenicity.

**Syno-P3 (SLALTGAVVAHAYYC/SEQ ID NO: 3),**

**Syno-P2 (TCRMDVLRASLPAQS/SEQ ID NO: 4),**

and

## Syno-P1 (GAATTTAAGTSATAC/SEQ ID NO: 5).

[0189] Keyhole limpet hemocyanin (KLH) was conjugated to each of the synthesized peptides via Cys within the amino acid sequence. 50 µg of each of the synthesized peptides conjugated to KLH was dissolved in 0.1 ml of physiological saline solution, and 0.1 ml of Freund's complete adjuvant (FCA) was added to prepare an immunogen. Each immunogen (0.2 ml) was injected hypodermically into the back of eight mice (BALB/c female, 5 weeks old), thus immunizing it. Immunization was performed once every two weeks for four times in total, and immunization was performed one more time one week later. Eight days after the final immunization, blood was drawn from the heart to obtain 200 µl or more serum. Spleen cells were taken from individuals in which an increase in the antibody titer was confirmed by ELISA, and then cell fusion was performed.

[0190] FIGS. 41-43 show the results of measuring the antibody titer by ELISA for the mouse serum of three individuals with respect to each of the immunogens. Each serum sample was assayed in triplicate, and the mean is shown on the graph. Individuals in which the antibody titer increased were confirmed when any of the immunogens was used. Thus, it was confirmed that each of these immunogens was useful as an immunogen of Synoviolin.

[0191] Myeloma cell line (P3U1) cells and mouse spleen cells were mixed in a 1:10 ratio and cell fusion was performed in the presence of 50% PEG (PEG1540 of Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). After fusion, 96 well plates were seeded so that the spleen cell count became  $5 \times 10^5$ /ml. After the cells were cultured for 10-14 days in a HAT culture medium, cell growth was confirmed and the culture supernatant was tested. An ELISA plate on which the various synthesized peptides was fixed was used to test the culture supernatant. The testing procedures are as follows. After the culture supernatant was reacted with the ELISA plate, anti-mouse IgG goat-pox was used to select positive wells. The wells to be used for cloning were selected and the cells of other positive wells were frozen and stored.

[0192] Several days later, each strain was seeded over one 96-well plate at 100 cells/plate (20 cells/ml), and cultured for 10-14 days. The colonies were determined and testing of the culture supernatant was performed. Testing of the culture supernatant was performed by applying 50 µl of supernatant to the aforementioned antigen-fixed ELISA plates for screening. Anti-mouse IgG goat-pox was used as the second antibody. After cultured, the selected colonies were recloned and cultured for 10-14 days. Then, colony determination and testing of the culture supernatant were performed in the same manner as given above. Wells were selected according to mother strain, and selected clones were cultured in a 24-well plate. The supernatant was recovered, and clones were checked. Then, the antibody subclass and antibody production were tested. As a result of the cloning, using Syno-P2 (SEQ ID NO: 4) as the immunogen, the two clones 10Db and 7Bc were selected as the hybridomas that produce monoclonal antibodies having the high affinity to Synoviolin.

## [Example 24] Detection of Synoviolin in Patient Specimens Using Anti-Synoviolin Monoclonal Antibodies

## &lt;1&gt; Western Blotting of Patient-Derived Synovial Cells with Anti-Synoviolin Monoclonal Antibodies

[0193] Using the two types of anti-Synoviolin monoclonal antibodies (10Db and 7Bc) that recognize Syno-P2 obtained in Example 23, proteins of rheumatoid arthritis (RA) patient-derived synovial cells were separated by SDS-PAGE and Western blotting was performed. The Western blotting procedure was as recited in Example 8 except that the monoclonal antibodies 10Db and 7Bc of Example 23 were used as the antibodies and anti-mouse IgG sheep-HRP was used as the labeled antibody. As a control, osteoarthritis (OA) patient-derived synovial cells were also analyzed. As a result, a signal specific to RA patient-derived synovial cells was detected (FIG. 44A). It was confirmed that the monoclonal antibodies obtained in Example 23 specifically recognized the synovial cells of RA patients. These monoclonal antibodies are useful in the detection of RA.

## &lt;2&gt; Fluorescent Immunostaining of RA Patient-Derived Synovial Cells with Anti-Synoviolin Monoclonal Antibodies

[0194] The monoclonal antibody 10Db was used to perform fluorescent immune cytochemical analysis of RA patient-derived synovial cells. The immunostaining procedure was as recited in Example 9 except that the monoclonal antibodies 10Db of Example 23 were used as the antibodies and anti-mouse IgG sheep-FITC was used as the labeled antibody. The Synoviolin protein signal was detected strongly in RA patient-derived synovial cells, but it was not detected in the control wherein only the secondary antibodies were reacted (FIG. 44B).

## &lt;3&gt; Immunostaining of RA Patient-Derived Synovial Tissues with Anti-Synoviolin Monoclonal Antibodies

[0195] The monoclonal antibodies 10Db and 7Bc were used to perform immunostaining of synovial tissue sections taken from RA patients. The immunostaining procedure was as recited in Example 9 except that the monoclonal an-

tibodies 10Db and 7Bc of Example 23 were used as the antibodies and anti-mouse IgG sheep-HRP was used as the labeled antibody. The Synoviolin protein signal was detected strongly in RA patient-derived synovial tissue (FIG. 45). A hyperplastic layer of synovial cells was observed by HE staining performed at the same time, and it was confirmed that the portion was stained by monoclonal antibodies. Based on these results, it was confirmed that the monoclonal antibodies of the present invention specifically recognized the synovial tissue of RA patients. As described above, RA testing and diagnosis can be performed by detecting Synoviolin in patient specimens using Synoviolin antibodies.

#### [Example 25] Detection of the Ubiquitin Ligase Activity of Synoviolin

**[0196]** E3 ubiquitin-protein ligase is known to undergo auto-ubiquitination (Hashizume R. et al., J. Biol. Chem. 276, 14537-14540, 2001). Thus, the present inventors studied whether Synoviolin has auto-ubiquitination activity or not. Plasmids comprising a FLAG-synoviolin gene inserted into a pCAGGS vector were transfected into HEK-293 cells and the cells were recovered 36 hours later. A cell extract was obtained with Buffer A [15 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.35% NP-40, 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin]. The cell extract was centrifuged in a high-speed centrifuge. To 0.6 ml of the supernatant, 3 µg of anti-FLAG antibodies and 7.5 µl of Protein A beads were added, and immunoprecipitation was performed overnight. The beads were washed three times with Buffer A or Buffer A to which 0.1% SDS was added, and then washed two times with Buffer B [25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.01% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM EDTA]. Then, 30 µl of ubiquitin ligase reaction solution [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaF, 10 mM okadaic acid, 2 mM ATP, 0.6 mM DTT, 1.5 µg GST-HA-ubiquitin, 40 ng yeast-derived E1, 0.3 µg UbcH5c(E2)] was added and it was allowed to react for 30 minutes at 37°C. 30 µl of 2×Laemmli SDS-loading buffer containing 0.1M DTT was added and boiled. Then, it was fractionated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Anti-FLAG antibodies (SIGMA) and anti-HA antibodies (Roche Diagnostics) were used as the primary antibodies. The detection of HRP activity was performed in the same manner as in Example 7. As controls, the extract from cells transfected with the FLAG-synoviolin gene only (before immunoprecipitation) and the solution obtained by performing immunoprecipitation of the cell extract (i.e. FLAG-Synoviolin protein and its immunocomplex only) were used. Moreover, reactions were also performed without adding any one of GST-HA-ubiquitin, ATP, E1 and E2 (when GST-HA-ubiquitin was not added, the reaction was performed using GST). FIG. 46 shows the results of using Synoviolin immunopurified by washing with 0.1% SDS-containing Buffer A. In the blotting with anti-HA antibodies, a band whose size was about 35 kDa larger than the molecular weight of Synoviolin (\* in FIG. 46) was detected (the arrow in FIG. 46). This band was also observed in the blotting with the anti-FLAG antibodies, and is thought to be that of a protein in which GST-HA-ubiquitin is fused to Synoviolin. Moreover, the reaction systems deficient in any one of ATP, E1 and E2 indicated that the auto-ubiquitination of Synoviolin did not occur. The same result was obtained when the beads were washed with Buffer A only. From these results, it is clear that 1) E1- and E2-dependent ubiquitin ligase activity is present in Synoviolin-containing immune complexes, and from the results of immunopurification, 2) Synoviolin has E3 ubiquitin-protein ligase activity.

#### Industrial Applicability

**[0197]** The present invention provides the gene "synoviolin" which encodes a novel protein that contributes to the development of synovial membranes and to the development of bone, cartilage and limbs. The gene according to the present invention is involved in RA and antibodies to the products of this gene are produced in RA patients. The gene and protein according to the present invention become new markers useful in the diagnosis of RA. The "synoviolin" according to the present invention is overexpressed in the joint synovial cells of RA patients and contributes to the diagnosis of the disease RA and judgment of the effectiveness of treatment by *in situ* hybridization and *in situ* PCR. Moreover, antibodies to Synoviolin can be detected with a high frequency in the blood of RA patients. Specific diagnosis of RA is possible using this as a marker. The Synoviolin protein provided by the present invention, or partial peptides thereof, are useful in the detection of antibodies to Synoviolin in the serum of patients.

**[0198]** In addition, Synoviolin is also expressed in undifferentiated mesenchymal cells. If Synoviolin is used as a cell marker, then it is possible to recover undifferentiated mesenchymal cells from fetal cells or the like. Undifferentiated mesenchymal cells are cells that are differentiated into bone and cartilage and are expected to have applications in regenerative medicine. To wit, if undifferentiated mesenchymal cells recovered using Synoviolin as a cell marker are differentiated *in vitro* or *in vivo* and the formation of bone or cartilage or reconstruction of joints is performed, it becomes possible to reconstruct anew bones, cartilaginous tissue or joints that have suffered injuries.

**[0199]** The Synoviolin and its ligand according to the present invention have been shown to have a close relationship with the hyperplasia of joint synovial cells which is a major pathology of RA. Accordingly, the Synoviolin or its ligand provided by the present invention gives important knowledge in the development of RA treatment methods. More specifically, by performing the screening of compounds that are involved in the binding between Synoviolin and its ligand, it is possible to proceed with the development of RA treatment techniques by a completely different approach

from that taken previously. Moreover, in the synoviolin transgenic mouse, hyperplasia of the joint synovial membranes and swelling of toe joints accompanying arthritis occur with a high frequency. The synoviolin transgenic animals provided by the present invention are extremely useful as a model of RA in the development of treatment techniques and pharmaceuticals.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENCE LISTING

5

<110> Locomogene, Inc.

10

<120> synovial cell protein

15

<130> BHP-A0001Y1P

20

<140>

<141>

25

<150> JP 2000-405082

<151> 2000-12-22

30

<150> JP 2001-266492

<151> 2001-06-27

35

<160> 7

40

<170> PatentIn Ver. 2.0

45

<210> 1

50

<211> 3374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

55



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (403).. (2256)

&lt;400&gt; 1

gccctttctt atgagcatgc ctgtgttggg ttgacagtga gggtaataat gacttggttg 60

ttgattgtag atatagggct ctcccttgca aggtaattag gctccttaaa ttacctgtaa 120

gattttcttg ccacagcatc cattctgggtt aggctggtga tcttctgagt agtgatagat 180

tggttggtgg tgaggtttac aggtgttccc ttctcttact cctggtgttg gctacaatca 240

ggtggcgtct agagcagcat gggacagggt ggtaagggga gtcttctcat tatgcagaag 300

tgatcaactt aaatctctgt cagatctacc tttatgtagc cgggcagtcg cgcggattga 360

gcgggctcgc ggcgctgggt tcttgggtctc cgggccaggg ca atg ttc cgc acg 414

Met Phe Arg Thr

1

gca gtg atg atg gcg gcc agc ctg gcg ctg acc ggg gct gtg gtg gct. 462

Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ala Val Val Ala

5

10

15

20

cac gcc tac tac ctc aaa cac cag ttc tac ccc act gtg gtg tac ctg 510

EP 1 352 961 A1

His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr Val Val Tyr Leu  
25 30 35  
5  
acc aag tcc agc ccc agc atg gca gtc ctg tac atc cag gcc ttt gtc 558  
10  
Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile Gln Ala Phe Val  
40 45 50  
15  
ctt gtc ttc ctt ctg ggc aag gtg atg ggc aag gtg ttc ttt ggg caa 606  
20  
Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val Phe Phe Gly Gln  
55 60 65  
25  
ctg agg gca gca gag atg gag cac ctt ctg gaa cgt tcc tgg tac gcc 654  
30  
Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg Ser Trp Tyr Ala  
70 75 80  
35  
gtc aca gag act tgt ctg gcc ttc acc gtt ttt cgg gat gac ttc agc 702  
40  
Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg Asp Asp Phe Ser  
85 90 95 100  
45  
ccc cgc ttt gtt gca ctc ttc act ctt ctt ctc ttc ctc aaa tgt ttc 750  
50  
Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe Leu Lys Cys Phe  
105 110 115  
55  
cac tgg ctg gct gag gac cgt gtg gac ttt atg gaa cgc agc ccc aac 798  
His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu Arg Ser Pro Asn  
120 125 130

EP 1 352 961 A1

atc tcc tgg ctc ttt cac tgc cgc att gtc tct ctt atg ttc ctc ctg 846  
 5 Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu Met Phe Leu Leu  
 135 140 145  
 10  
 ggc atc ctg gac ttc ctc ttc gtc agc cac gcc tat cac agc atc ctg 894  
 15 Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr His Ser Ile Leu  
 150 155 160  
 20  
 acc cgt ggg gcc tct gtg cag ctg gtg ttt ggc ttt gag tat gcc atc 942  
 Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe Glu Tyr Ala Ile  
 25 165 170 175 180  
 30  
 ctg atg acg atg gtg ctc acc atc ttc atc aag tat gtg ctg cac tcc 990  
 Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr Val Leu His Ser  
 185 190 195  
 35  
 gtg gac ctc cag agt gag aac ccc tgg gac aac aag gct gtg tac atg 1038  
 40 Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys Ala Val Tyr Met  
 200 205 210  
 45  
 ctc tac aca gag ctg ttt aca ggc ttc atc aag gtt ctg ctg tac atg 1086  
 Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val Leu Leu Tyr Met  
 50 215 220 225  
 55  
 gcc ttc atg acc atc atg atc aag gtg cac acc ttc cca ctc ttt gcc 1134

EP 1 352 961 A1

Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe Pro Leu Phe Ala

230

235

240

5

atc cgg ccc atg tac ctg gcc atg aga cag ttc aag aaa gct gtg aca 1182

10

Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys Lys Ala Val Thr

245

250

255

260

15

gat gcc atc atg tct cgc cga gcc atc cgc aac atg aac acc ctg tat 1230

20

Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met Asn Thr Leu Tyr

265

270

275

25

cca gat gcc acc cca gag gag ctc cag gca atg gac aat gtc tgc atc 1278

Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp Asn Val Cys Ile

30

280

285

290

35

atc tgc cga gaa gag atg gtg act ggt gcc aag aga ctg ccc tgc aac 1326

Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg Leu Pro Cys Asn

295

300

305

40

cac att ttc cat acc agc tgc ctg cgc tcc tgg ttc cag cgg cag cag 1374

45

His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe Gln Arg Gln Gln

310

315

320

50

acc tgc ccc acc tgc cgt atg gat gtc ctt cgt gca tcg ctg cca gcg 1422

Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu Pro Ala

55

325

330

335

340

EP 1 352 961 A1

5 cag tca cca cca ccc ccg gag cct gcg gat cag ggg cca ccc cct gcc 1470  
 Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly Pro Pro Pro Ala  
 345 350 355  
 10 ccc cac ccc cca cca ctc ttg cct cag ccc ccc aac ttc ccc cag ggc 1518  
 Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn Phe Pro Gln Gly  
 15 360 365 370  
 20 ctc ctg cct cct ttt cct cca ggc atg ttc cca ctg tgg ccc ccc atg 1566  
 Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu Trp Pro Pro Met  
 25 375 380 385  
 30 ggc ccc ttt cca cct gtc ccg cct ccc ccc agc tca gga gag gct gtg 1614  
 Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Gly Glu Ala Val  
 390 395 400  
 35 gct cct cca tcc acc agt gca gca gcc ctt tct cgg ccc agt gga gca 1662  
 Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Ser Gly Ala  
 40 405 410 415 420  
 45 gct aca acc aca gct gct ggc acc agt gct act gct gct tct gcc aca 1710  
 Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ala Thr  
 50 425 430 435  
 55 gca tct ggc cca ggc tct ggc tct gcc cca gag gct ggc cct gcc cct 1758

EP 1 352 961 A1

	Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly Pro Ala Pro	
5	440 445 450	
	ggt ttc ccc ttc cct cct ccc tgg atg ggt atg ccc ctg cct cca ccc	1806
10	Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu Pro Pro Pro	
	455 460 465	
15	ttt gcc ttc ccc cca atg cct gtg ccc cct gcg ggc ttt gct ggg ctg	1854
20	Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe Ala Gly Leu	
	470 475 480	
25	acc cca gag gag cta cga gct ctg gag ggc cat gag cgg cag cac ctg	1902
	Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg Gln His Leu	
30	485 490 495 500	
35	gag gcc cgg ctg cag agc ctg cgt aac atc cac aca ctg ctg gac gcc	1950
	Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu Leu Asp Ala	
	505 510 515	
40	gcc atg ctg cag atc aac cag tac ctc acc gtg ctg gcc tcc ttg ggg	1998
45	Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala Ser Leu Gly	
	520 525 530	
50	ccc ccc cgg cct gcc act tca gtc aac tcc act gag ggg act gcc act	2046
	Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly Thr Ala Thr	
55	535 540 545	

EP 1 352 961 A1

aca gtt gtt gct gct gcc tcc tcc acc agc atc cct agc tca gag gcc 2094  
5 Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser Ser Glu Ala  
550 555 560

acg acc cca acc cca gga gcc tcc cca cca gcc cct gaa atg gaa agg 2142  
10 Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu Met Glu Arg  
15 565 570 575 580

cct cca gct cct gag tca gtg ggc aca gag gag atg cct gag gat gga 2190  
20 Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro Glu Asp Gly  
25 585 590 595

gag ccc gat gca gca gag ctc cgc cgg cgc cgc ctg cag aag ctg gag 2238  
30 Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln Lys Leu Glu  
600 605 610

tct cct gtt gcc cac tga cactgcccc gcccagcccc agcctctgct 2286  
40 Ser Pro Val Ala His  
615

cttttgagca gccctcgctg gaacatgtcc tgccaccaag tgccagctcc ctctctgtct 2346  
45

gcaccaggga gtagtaccac cagctctgag aaagaggcgg catcccctag gccaaagtga 2406  
50

aagaggctgg ggttccatt tgactccagt cccaggcagc catggggatc tcgggtcagt 2466  
55

5 tccagccttc ctctccaact cttcagccct gtgttctgct ggggccatga aggcagaagg 2526

10 ttagcctct gagaagccct cttcttcccc caccoccttc caggagaagg ggctgccct 2586

15 ccaagcccta cttgtatgtg cggagtcaca ctgcagtgcc gaacagtatt agctcccgtt 2646

20 cccaagtgtg gactccagag gggctggagg caagctatga acttgctcgc tggeccaccc 2706

25 ctaagactgg taccatttc cttttcttac cctgatctcc ccagaagcct cttgtggtgg 2766

30 tggtgtgcc ccctatgcc tgtggcattt ctgcgtctta ctggcaacca cacaactcag 2826

35 ggaaaggaat gcctgggagt gggggtgcag gcgggcagca ctgagggacc ctgccccgcc 2886

40 cctcccccca ggcccccttc ccctgcagct tctcaagtga gactgacctg tctcaccag 2946

45 cagccactgc ccagccgcac tccaggcaag ggccagtgcg cctgctcctg accactgcaa 3006

50 tcccagcgcc caaggaaggc cacttctcaa ctggcagaac ttctgaagtt tagaattgga 3066

55 attacttct tactagtgtc ttttggetta aattttgtct tttgaagttg aatgcttaat 3126

60 cccgggaaag aggaacagga gtgccagact cctggtcttt ccagtttaga aaaggctctg 3186

65 tgccaaggag ggaccacagg agctgggacc tgccctcccc tgtcctttcc ccttggtttt 3246



gtgttacaag agttgttgga gacagtttca gatgattatt taatttgtaa atattgtaca 3306

aattttaata gcttaaattg tatatacagc caaataaaaa cttgcattaa caaaaaaaaaa 3366

aaaaaaaa

3374

<210> 2

<211> 617

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly

1

5

10

15

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr

20

25

30

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile

35

40

45

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val

50

55

60

EP 1 352 961 A1

Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg

65 70 75 80

5

Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg

85 90 95

10

Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe

100 105 110

15

Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu

115 120 125

20

Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu

130 135 140

25

Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr

145 150 155 160

30

His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe

165 170 175

35

Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr

180 185 190

40

Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys

195 200 205

45

5           Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val  
           210                           215                           220

10       Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe  
       225                           230                           235                           240

15       Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys  
                           245                           250                           255

20       Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met  
       25                           260                           265                           270

30       Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp  
                           275                           280                           285

35       Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg  
                           290                           295                           300

40       Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe  
       45                           305                           310                           315                           320

50       Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala  
                           325                           330                           335

55       Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly

EP 1 352 961 A1

	340	345	350
5	Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn		
	355	360	365
10	Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu		
15	370	375	380
20	Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser		
	385	390	395 400
25	Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg		
	405	410	415
30	Pro Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala		
35	420	425	430
40	Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala		
	435	440	445
45	Gly Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro		
	450	455	460
50	Leu Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly		
55	465	470	475 480

EP 1 352 961 A1

Phe Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu

5

485

490

495

Arg Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr

10

500

505

510

Leu Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu

15

515

520

525

20

Ala Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu

530

535

540

25

Gly Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro

30

545

550

555

560

Ser Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro

35

565

570

575

40

Glu Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met

580

585

590

45

Pro Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu

50

595

600

605

Gln Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His

55

610

615

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 3

Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Cys

1

5

10

15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 4

EP 1 352 961 A1

Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu Pro Ala Gln Ser

1 5 10 15

5

10

<210> 5

<211> 15

15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

25

synthesized sequence

30

<400> 5

Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Cys

1 5 10 15

35

40

<210> 6

<211> 3028

45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

50

<220>

<221> CDS

55

<222> (60).. (1910)

&lt;400&gt; 6

5 gcagtcgcgc ggattgagcg ggctcgcggc gctgggttcc tggctctcgg gccagggca 59  
  
 10 atg ttc cgc acg gca gtg atg atg gcg gcc agc ctg gcg ctg acc ggg 107  
 Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly  
 1 5 10 15  
  
 15 gct gtg gtg gct cac gcc tac tac ctc aaa cac cag ttc tac ccc act 155  
 20 Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr  
 20 25 30  
  
 25 gtg gtg tac ctg acc aag tcc agc ccc agc atg gca gtc ctg tac atc 203  
 30 Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile  
 35 40 45  
  
 35 cag gcc ttt gtc ctt gtc ttc ctt ctg ggc aag gtg atg ggc aag gtg 251  
 Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val  
 40 50 55 60  
  
 45 ttc ttt ggg caa ctg agg gca gca gag atg gag cac ctt ctg gaa cgt 299  
 Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg  
 65 70 75 80  
  
 50 tcc tgg tac gcc gtc aca gag act tgt ctg gcc ttc acc gtt ttt cgg 347  
 55 Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg



	85	90	95	
5	gat gac ttc agc ccc cgc ttt gtt gca ctc ttc act ctt ctt ctc ttc			395
	Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe			
10	100	105	110	
15	ctc aaa tgt ttc cac tgg ctg gct gag gac cgt gtg gac ttt atg gaa			443
	Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu			
20	115	120	125	
25	cgc agc ccc aac atc tcc tgg ctc ttt cac tgc cgc att gtc tct ctt			491
	Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu			
30	130	135	140	
35	atg ttc ctc ctg ggc atc ctg gac ttc ctc ttc gtc agc cac gcc tat			539
	Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr			
40	145	150	155	160
45	cac agc atc ctg acc cgt ggg gcc tct gtg cag ctg gtg ttt ggc ttt			587
	His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe			
50	165	170	175	
55	gag tat gcc atc ctg atg acg atg gtg ctc acc atc ttc atc aag tat			635
	Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr			
	180	185	190	

EP 1 352 961 A1

gtg ctg cac tcc gtg gac ctc cag agt gag aac ccc tgg gac aac aag 683  
 5 Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys  
 195 200 205

gct gtg tac atg ctc tac aca gag ctg ttt aca ggc ttc atc aag gtt 731  
 10 Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val  
 15 210 215 220

ctg ctg tac atg gcc ttc atg acc atc atg atc aag gtg cac acc ttc 779  
 20 Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe  
 225 230 235 240

cca ctc ttt gcc atc cgg ccc atg tac ctg gcc atg aga cag ttc aag 827  
 30 Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys  
 245 250 255

aaa gct gtg aca gat gcc atc atg tct cgc cga gcc atc cgc aac atg 875  
 35 Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met  
 40 260 265 270

aac acc ctg tat cca gat gcc acc cca gag gag ctc cag gca atg gac 923  
 45 Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp  
 50 275 280 285

aat gtc tgc atc atc tgc cga gaa gag atg gtg act ggt gcc aag aga 971  
 55 Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg

EP 1 352 961 A1

	290	295	300	
5				
	ctg ccc tgc aac cac att ttc cat acc agc tgc ctg cgc tcc tgg ttc			1019
10	Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe			
	305	310	315	320
15				
	cag cgg cag cag acc tgc ccc acc tgc cgt atg gat gtc ctt cgt gca			1067
	Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala			
20		325	330	335
25				
	tgc ctg cca gcg cag tca cca cca ccc ccg gag cct gcg gat cag ggg			1115
	Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly			
30		340	345	350
35				
	cca ccc cct gcc ccc cac ccc cca cca ctc ttg cct cag ccc ccc aac			1163
	Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn			
40		355	360	365
45				
	ttc ccc cag ggc ctc ctg cct cct ttt cct cca ggc atg ttc cca ctg			1211
	Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu			
50		370	375	380
55				
	tgg ccc ccc atg ggc ccc ttt cca cct gtc ccg cct ccc ccc agc tca			1259
	Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser			
	385	390	395	400

EP 1 352 961 A1

5 gga gag gct gtg gct cct cca tcc acc agt gca gcc ctt tct cgg ccc 1307  
 Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Leu Ser Arg Pro  
 405 410 415

10 agt gga gca gct aca acc aca gct gct ggc acc agt gct act gct gct 1355  
 Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala  
 15 420 425 430

20 tct gcc aca gca tct ggc cca ggc tct ggc tct gcc cca gag gct ggc 1403  
 Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly  
 25 435 440 445

30 cct gcc cct ggt ttc ccc ttc cct cct ccc tgg atg ggt atg ccc ctg 1451  
 Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu  
 450 455 460

35 cct cca ccc ttt gcc ttc ccc cca atg cct gtg ccc cct gcg ggc ttt 1499  
 Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe  
 40 465 470 475 480

45 gct ggg ctg acc cca gag gag cta cga gct ctg gag ggc cat gag cgg 1547  
 Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg  
 50 485 490 495

55 cag cac ctg gag gcc cgg ctg cag agc ctg cgt aac atc cac aca ctg 1595  
 Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu

EP 1 352 961 A1

	500	505	510	
5				
	ctg gac gcc gcc atg ctg cag atc aac cag tac ctc acc gtg ctg gcc			1643
10	Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala			
	515	520	525	
15				
	tcc ttg ggg ccc ccc cgg cct gcc act tca gtc aac tcc act gag ggg			1691
	Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly			
20	530	535	540	
25				
	act gcc act aca gtt gtt gct gct gcc tcc tcc acc agc atc cct agc			1739
	Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser			
30	545	550	555	560
35				
	tca gag gcc acg acc cca acc cca gga gcc tcc cca cca gcc cct gaa			1787
	Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu			
40	565	570	575	
45				
	atg gaa agg cct cca gct cct gag tca gtg ggc aca gag gag atg cct			1835
	Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro			
50	580	585	590	
55				
	gag gat gga gag ccc gat gca gca gag ctc cgc cgg cgc cgc ctg cag			1883
	Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln			
	595	600	605	

EP 1 352 961 A1

aag ctg gag tct cct gtt gcc cac tga cactgcccc gcccagcccc 1930  
5 Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His  
610 615

10 agcctctgct cttttgagca gccctcgctg gaacatgtcc tgccaccaag tgccagctcc 1990

15 ctctctgtct gcaccaggga gtagtaccac cagctctgag aaagaggcgg catcccctag 2050

20 gccaaagtga aagaggctgg gggtccatt tgactccagt cccaggcagc catggggatc 2110

25 tcgggtcagt tccagccttc ctctccaact cttcagccct gtgttctgct ggggccatga 2170

30 aggcagaagg tttagcctct gagaagccct cttcttcccc caccctttc caggagaagg 2230

35 ggctgcccct ccaagcccta ctgtatgtg cggagtcaca ctgcagtgcc gaacagtatt 2290

40 agctcccggt cccaagtgtg gactccagag gggctggagg caagctatga acttgctcgc 2350

45 tgccccacc ctaagactgg taccatttc cttttcttac cctgatctcc ccagaagcct 2410

50 cactgtgtgg tggtgtgcc ccctatgcc tgtggcattt ctgcgtctta ctggcaacca 2470

55 cacaactcag ggaaaggaat gcctgggagt gggggtgcag gcgggcagca ctgagggacc 2530

ctgccccgcc cctcccccca ggcccccttc cctgcagct tctcaagtga gactgacctg 2590

EP 1 352 961 A1

tctcaccag cagccactgc ccagccgcac tccaggcaag ggccagtgcg cctgctcctg 2650

5

accactgcaa tcccagcgcc caaggaaggc cacttctcaa ctggcagaac ttctgaagtt 2710

10

tagaattgga attacttcct tactagtgtc ttttggtta aattttgtct tttgaagttg 2770

15

aatgcttaat cccgggaaag aggaacagga gtgccagact cctgggtctt ccagtttaga 2830

20

aaaggctctg tgccaaggag ggaccacagg agctgggacc tgccctgccc tgcctttcc 2890

25

ccttggtttt gtgttacaag agttgttgga gacagtttca gatgattatt taatttgtaa 2950

30

atattgtaca aattttaata gcttaaattg tatatacagc caaataaaaa ctgcattaa 3010

caaaaaaaaa aaaaaaaaa

3028

35

<210> 7

40

<211> 616

<212> PRT

45

<213> Homo sapiens

50

<400> 7

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly

1

5

10

15

55

EP 1 352 961 A1

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr

20

25

30

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile

35

40

45

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val

50

55

60

Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg

65

70

75

80

Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg

85

90

95

Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe

100

105

110

Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu

115

120

125

Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu

130

135

140

Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr

145

150

155

160



5 His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe  
 165 170 175

10 Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr  
 180 185 190

15 Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys  
 195 200 205

20 Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val  
 210 215 220

25 Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe  
 225 230 235 240

30 Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys  
 245 250 255

35 Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met  
 260 265 270

40 Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp  
 275 280 285

45 Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg

EP 1 352 961 A1

	290	295	300
5			
	Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe		
10	305	310	315 320
15	Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala		
	325	330	335
20	Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly		
	340	345	350
25			
	Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn		
30	355	360	365
35	Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu		
	370	375	380
40			
	Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser		
	385	390	395 400
45			
	Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Leu Ser Arg Pro		
50	405	410	415
55	Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala		
	420	425	430

EP 1 352 961 A1

5	Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly	435	440	445
10	Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu	450	455	460
15	Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe	465	470	475 480
20	Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg	485	490	495
25	Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu	500	505	510
30	Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala	515	520	525
35	Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly	530	535	540
40	Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser	545	550	555 560
45	Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu	565	570	575

Met. Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro

5

580

585

590

Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln

10

595

600

605

Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His

15

610

615

20

# Claims

25

1. A polynucleotide selected from the group consisting of (a) through (e) below:

(a) a polynucleotide that encodes a protein comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2,  
 (b) a polynucleotide comprising a protein coding domain of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1,  
 (c) a polynucleotide encoding a protein that comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 in  
 which one or more amino acids are substituted, deleted, inserted and/or added and that is functionally equiv-  
 alent to the protein consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2,  
 (d) a polynucleotide that hybridizes under stringent conditions with a polynucleotide consisting of the nucleotide  
 sequence shown in SEQ ED NO: 1 and that encodes a protein functionally equivalent to the protein consisting  
 of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, and  
 (e) a polynucleotide that comprises a nucleotide sequence having at least 70% or greater identity to the nu-  
 cleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 and that encodes a protein functionally equivalent to the protein  
 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2.

30

35

2. A polynucleotide that encodes a partial peptide of a protein consisting of the amino acid sequence shown in SEQ  
 ID NO: 2.

40

3. A protein or peptide encoded by the polynucleotide according to claim 1 or 2.

4. The protein or peptide according to claim 3 that has at least one activity selected from the group consisting of the  
 following (1) through (3):

45

(1) binds to antibodies found in the blood of rheumatoid arthritis patients,  
 (2) binds to the Synoviolin ligand S1-5, and  
 (3) promotes synovial membrane hyperplasia.

50

5. A vector into which the polynucleotide according to claim 1 or 2 is inserted.

6. A transformed cell that carries the polynucleotide according to claim 1 or the vector according to claim 5.

55

7. A method of manufacturing the protein or peptide according to claim 3, said method comprising the steps of culturing  
 the transformed cell according to claim 6 and recovering the expressed protein or peptide from said transformed  
 cell or the culture supernatant.

8. An antibody that binds to the protein or peptide according to claim 3.
9. An immunological analysis reagent for analyzing antibodies that recognize the protein or peptide according to claim 3, said reagent comprising the protein or peptide according to claim 3.
- 5 10. The immunological analysis reagent according to claim 9, wherein the reagent is used to diagnose rheumatoid arthritis or to judge effectiveness of treating it.
- 10 11. An immunological analysis reagent for analyzing the protein according to claim 3, said reagent comprising an antibody that reacts with the protein or peptide according to claim 3.
12. The immunological analysis reagent according to claim 11, wherein the reagent is used to diagnose rheumatoid arthritis or to judge effectiveness of treating it.
- 15 13. The immunological analysis reagent according to claim 12, wherein the protein according to claim 3 is present in synovial cells.
14. A method of measuring antibodies in a biological specimen, wherein said antibodies bind to the protein according to claim 3 and/or a partial peptide thereof, said method comprising the following steps of:  
20 (1) contacting the biological specimen with the protein according to claim 3 and/or a partial peptide thereof, and  
(2) detecting the antibodies that bind to the protein according to claim 3 and/or a partial peptide thereof.
- 15 15. A method of measuring the protein according to claim 3 and/or a partial peptide thereof in a biological specimen, said method comprising the following steps of:  
25 (1) contacting the biological specimen with the antibody according to claim 8, and  
(2) detecting the antibody according to claim 8, wherein said antibody binds to the protein according to claim 3 and/or a partial peptide thereof.
- 30 16. A polynucleotide that comprises at least 15 nucleotides and that is complementary to a polynucleotide consisting of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or to a complementary strand thereof.
- 35 17. A method of measuring the polynucleotide according to claim 1 or 2 in a biological specimen, said method comprising the following steps of:  
(1) contacting the biological specimen with the polynucleotide according to claim 16, and  
(2) detecting the polynucleotide according to claim 16, wherein said polynucleotide hybridizes with the polynucleotide according to claim 1 or 2.
- 40 18. A kit for measuring the polynucleotide according to claim 1 or 2, said kit comprising the polynucleotide according to claim 16.
- 45 19. A method of detecting or isolating cells that express the protein according to claim 3, said method comprising the step of using, as an index, said protein or the expression of a gene that encodes said protein.
20. The method according to claim 19, wherein said cells are rheumatoid synovial cells.
21. The method according to claim 19, wherein said cells are undifferentiated mesenchymal cells.
- 50 22. A reagent for the detection or isolation of cells that express the protein according to claim 3, said reagent comprising the antibody according to claim 8.
- 55 23. A method of detecting rheumatoid arthritis, wherein the marker for rheumatoid arthritis is at least one selected from the group consisting of the polynucleotide according to claim 1, the protein according to claim 3, the peptide according to claim 3, antibodies that bind to the protein according to claim 3, and antibodies that bind to the peptide according to claim 3, the method comprising the following steps of:

- i) detecting the markers for rheumatoid arthritis present in a biological specimen from a subject, and
- ii) associating the results of detection of step i) with rheumatoid arthritis.

24. The method according to claim 23, wherein the biological specimen is blood from a subject and the marker for rheumatoid arthritis comprises antibodies that bind to the protein according to claim 3 and/or antibodies that bind to the peptide according to claim 3.

25. The method according to claim 23, wherein the biological specimen comprises synovial tissue or synovial cells from a subject and the marker for rheumatoid arthritis comprises the polynucleotide according to claim 1 and/or the protein according to claim 3.

26. A method of detecting the binding activity of a test compound to the protein or peptide according to claim 3, said method comprising the following steps of:

- a) contacting the test compound with the protein or peptide according to claim 3, and
- b) observing the binding of the test compound to said protein or peptide.

27. A method of screening compounds that have the activity of binding to the protein or peptide according to claim 3, said method comprising the following steps of:

- a) detecting the binding activity of test compounds to the protein or peptide according to claim 3 by the method according to claim 26, and
- b) selecting the test compounds the binding activity of which is higher than a control.

28. A method of detecting the activity of blocking the binding of the protein according to claim 3 to its ligand, said method comprising the following steps of:

- a) contacting the protein or peptide according to claim 3 with its ligand in the presence of a test compound, and
- b) detecting the ligand and/or test compound that bind to said protein or peptide.

29. The method according to claim 28, wherein the ligand is the Synoviolin ligand S1-5.

30. A method of screening compounds that have the activity of blocking the binding of the protein according to claim 3 to its ligand, said method comprising the following steps of:

- a) detecting the activity of test compounds to block the binding of the protein according to claim 3 to its ligand by the method according to claim 28, and
- b) selecting the test compounds said blocking activity of which is higher than a control.

31. A method of detecting the activity of a test compound to regulate signal transduction via the protein according to claim 3, said method comprising the following steps of:

- a) contacting the test compound with said protein either in the presence of, or in the absence of, the ligand of said protein, and
- b) detecting signal transduction via said protein.

32. A method of screening compounds that have the activity of regulating signal transduction via the protein according to claim 3, said method comprising the following steps of:

- a) detecting the activity of test compounds to regulate signal transduction via the protein by the method according to claim 31, and
- b) selecting the test compounds said regulation activity of which is higher than a control.

33. A method of detecting the activity of regulating the expression of the polynucleotide according to claim 1, said method comprising the following steps of:

- a) culturing cells that express the polynucleotide according to claim 1 in the presence of a test compound, and
- b) measuring the expression level of said polynucleotide.

34. A method of screening compounds that regulate the expression of the polynucleotide according to claim 1, said method comprising the following steps of:

- a) detecting the activity of test compounds to regulate the expression of the polynucleotide according to claim 1 by the method according to claim 33, and
- b) selecting the test compounds that have a difference in said activity in comparison to a control.

35. An agent that stimulates Synoviolin, said agent comprising as an active ingredient a compound that is obtainable by the screening method according to claim 27.

36. An agent that blocks the binding between Synoviolin and Synoviolin ligand, said agent comprising as an active ingredient a compound that is obtainable by the screening method according to claim 30.

37. An agent that blocks synovial hyperplasia, said agent comprising as an active ingredient a compound that is obtainable by the screening method according to claim 30 or 32.

38. A pharmaceutical composition that comprises as an active ingredient a component selected from the group consisting of the polynucleotide according to claim 1 or 2, the protein or peptide according to claim 3, and the vector according to claim 5.

39. A transgenic non-human vertebrate in which the expression of the polynucleotide according to claim 1 or 2 is modified or said modification is inducible.

40. The transgenic non-human vertebrate according to claim 39, wherein the polynucleotide according to claim 1 or 2 is exogenously transformed.

41. The transgenic non-human vertebrate according to claim 40, wherein said vertebrate is a rheumatoid arthritis model animal.

42. A transgenic non-human vertebrate in which the expression of the endogenous polynucleotide according to claim 1 or 2 is suppressed.

43. The transgenic non-human vertebrate according to claim 42, wherein another gene is knocked in.

44. A cell derived from the transgenic non-human vertebrate according to claim 40 or 42.

45. A method of detecting the activity of regulating the activity of an endogenous promoter of the polynucleotide according to claim 1 or 2, said method comprising the following steps of:

- a) contacting a test compound with an expression system that expresses a reporter gene under the control of the endogenous promoter of the polynucleotide according to claim 1 or 2, and
- b) measuring the expression level of the reporter gene.

46. The method according to claim 45, wherein said expression system is the transgenic non-human vertebrate according to claim 43 or cells derived from the vertebrate.

47. A method of screening compounds that regulate the activity of the endogenous promoter of the polynucleotide according to claim 1 or 2, said method comprising the following steps of:

- a) measuring the activity of test compounds to regulate the activity of the endogenous promoter of the polynucleotide according to claim 1 or 2 by the method according to claim 45, and
- b) selecting the test compounds that have a difference in said activity in comparison to a control.

48. A pharmaceutical composition for regulating the expression of the polynucleotide according to claim 1, said pharmaceutical composition comprising as an active ingredient a compound that is obtainable by the screening method according to claim 34 or 47.

Figure 1

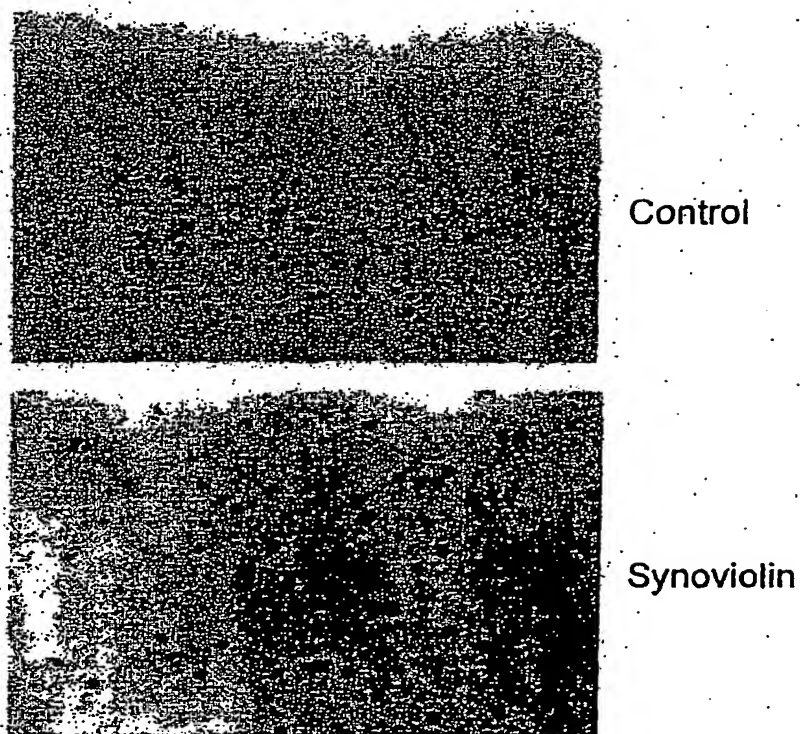




Figure 2

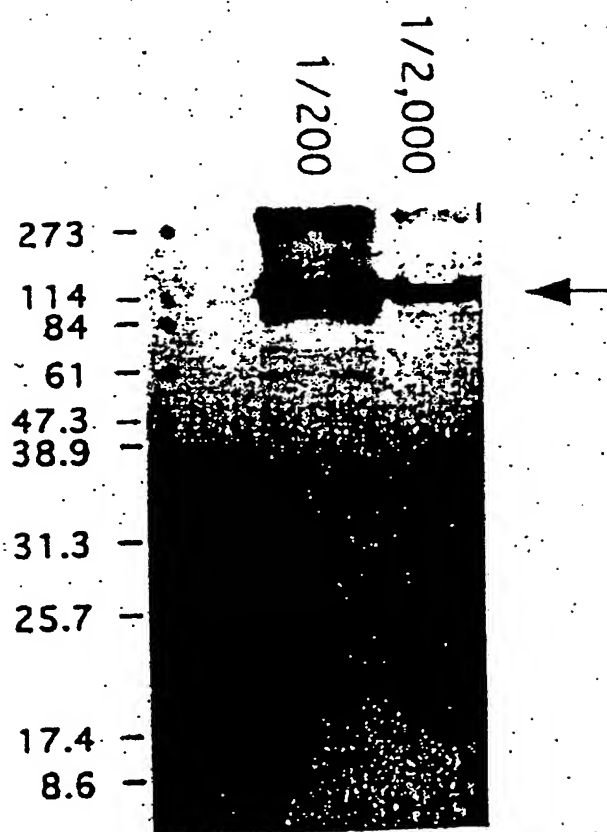


Figure 3

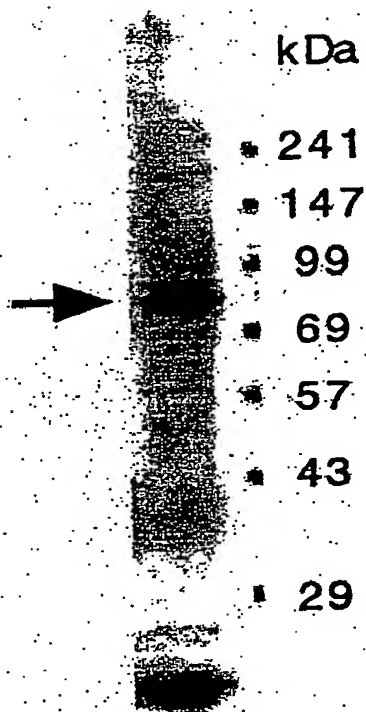


Figure 4

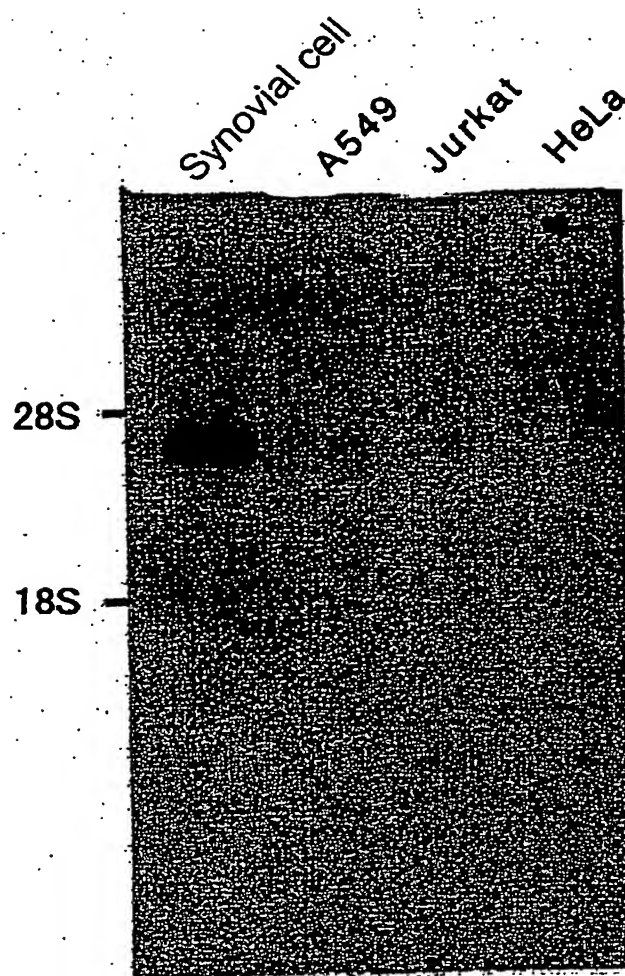


Figure 5

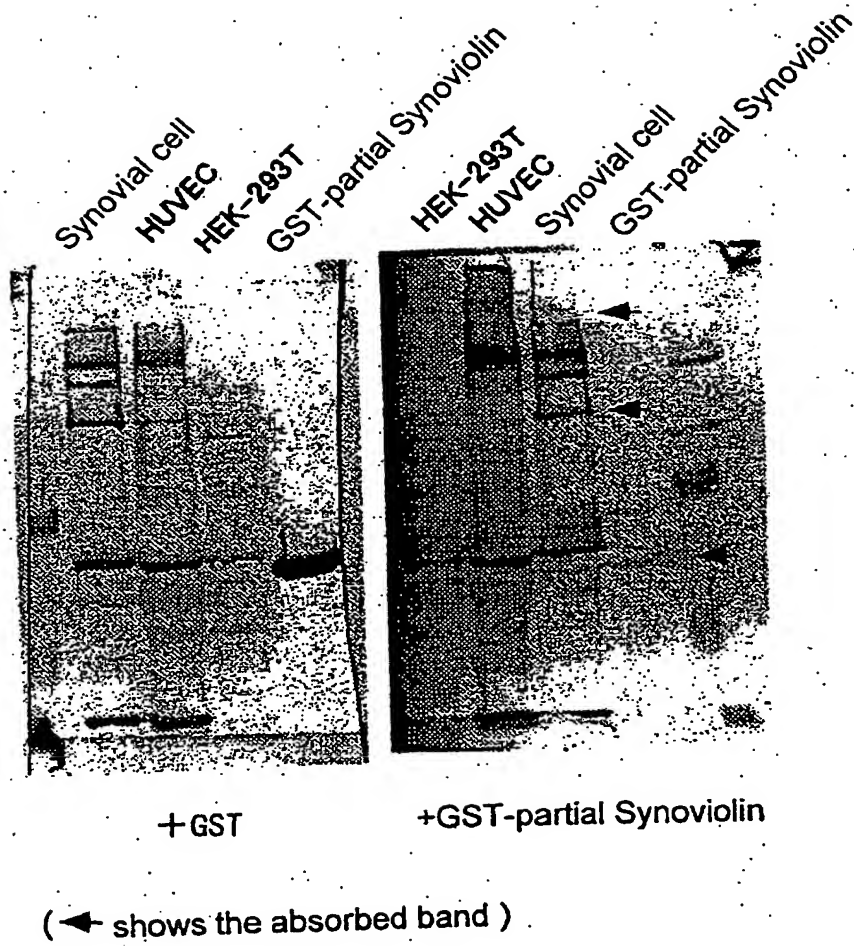
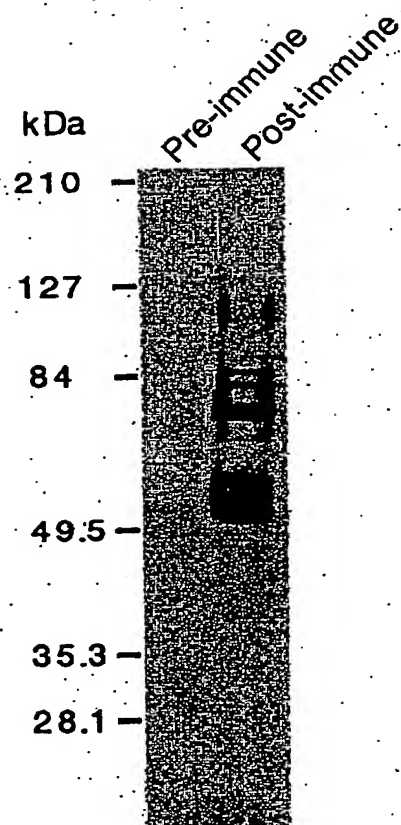


Figure 6

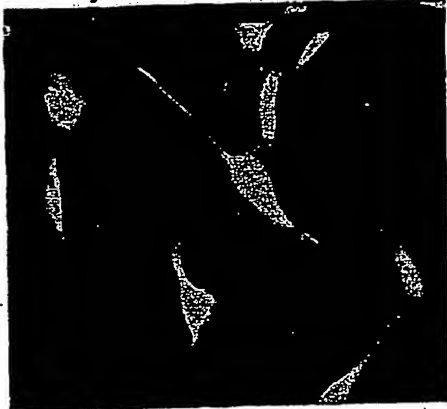


Pre-immune; Rabbit anti-serum prior to immunization of synovial cell  
Post-immune; Synovial cell anti-serum

Figure 7

A Fluorescent immunostaining on synovial cell with anti-synovial cell anti-serum

Anti-synovial cell anti-serum



+GST-partial Synoviolin



B Fluorescent immunostaining with purified anti-synovial cell antibodies

GST-column-eluted fraction



GST-partial Synoviolin column-eluted fraction



Figure 8



Anti-synovial cell anti-serum

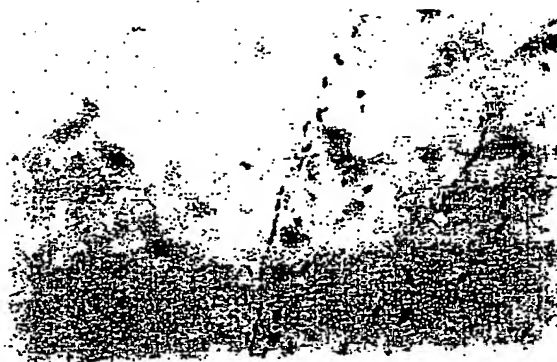


Anti-synovial cell anti-serum  
+GST



Anti-synovial cell anti-serum  
+GST-partial synoviolin

Figure 9



Purification through  
GST-GS column



Purification through  
GST-partial Synoviolin-  
GS column



Figure 10

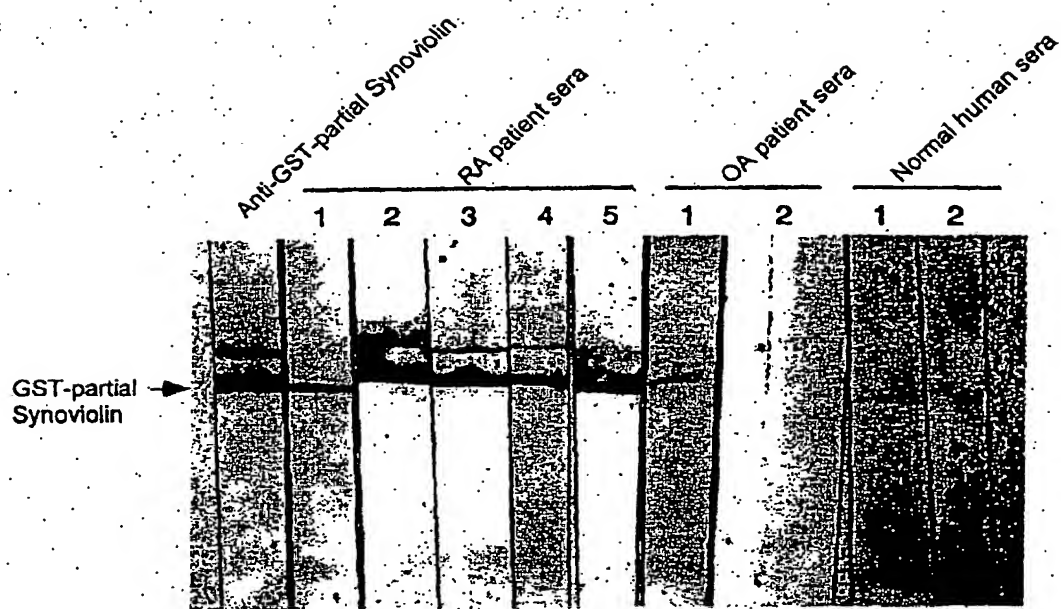


Figure 11

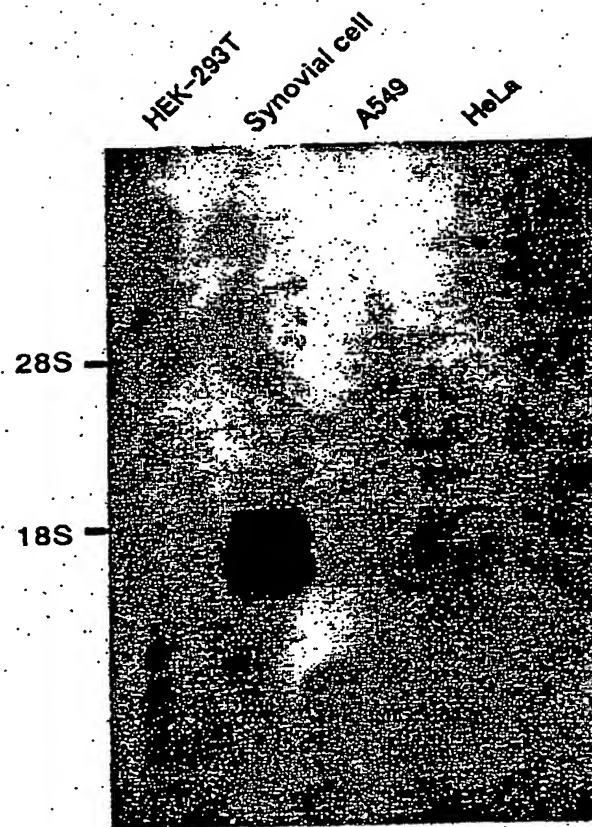
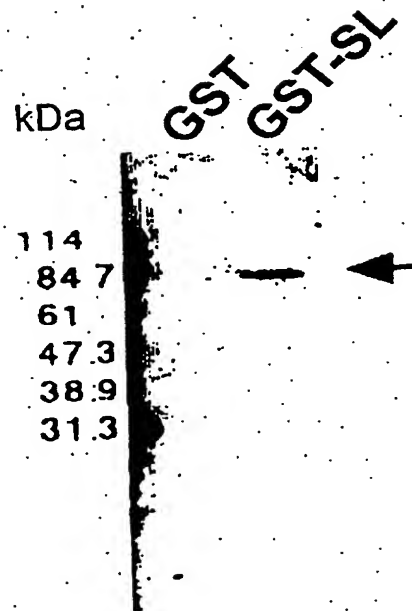


Figure 12



Probe: [ $^{35}$ S]HA-Synoviolin-HAHA

Figure 13

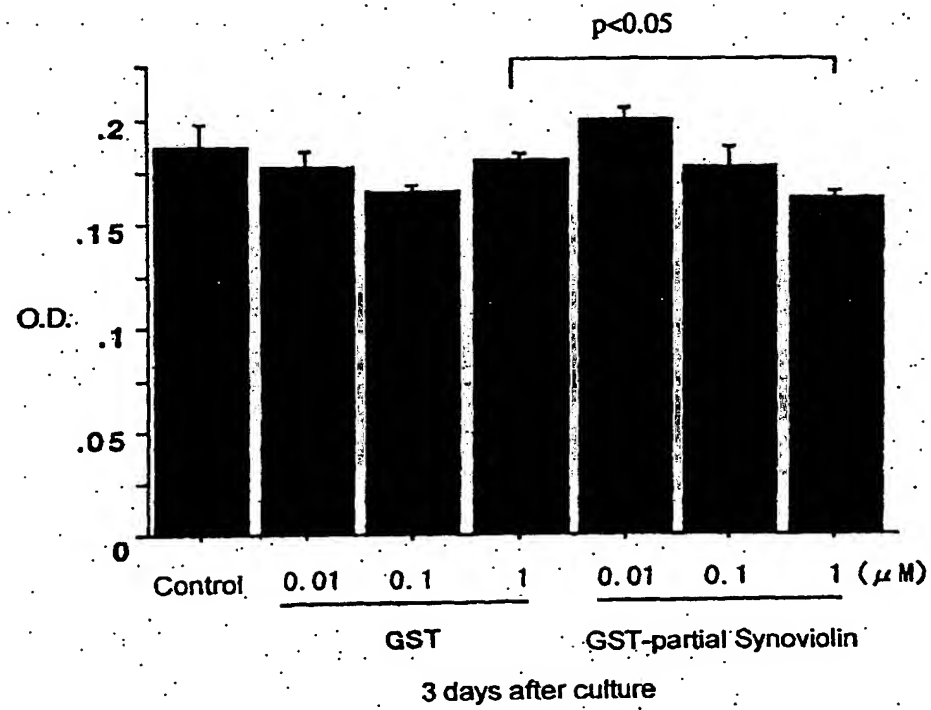


Figure 14

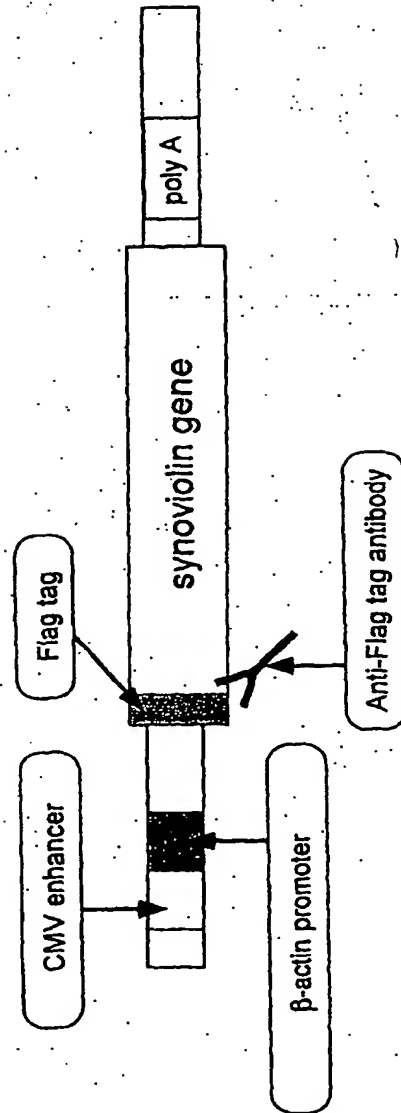


Figure 15

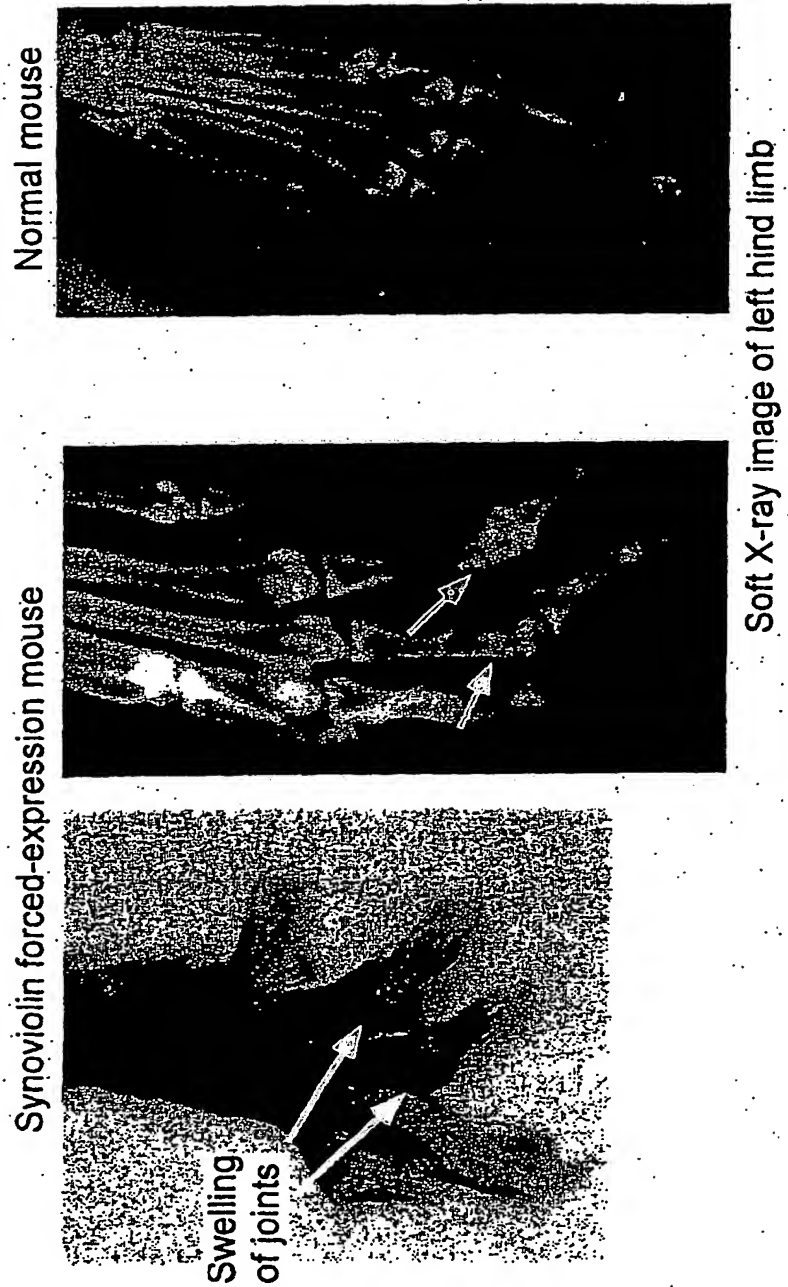


Figure 16

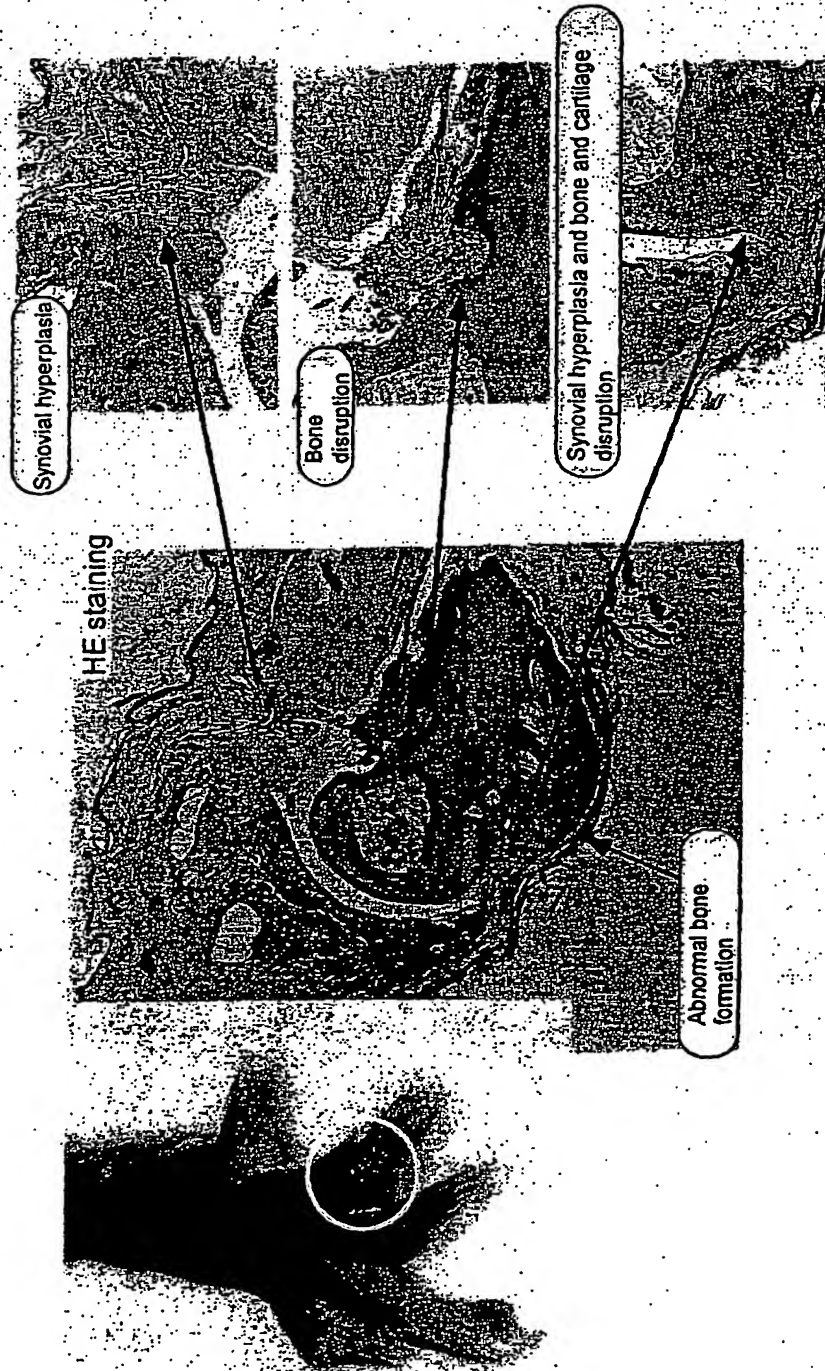


Figure 17

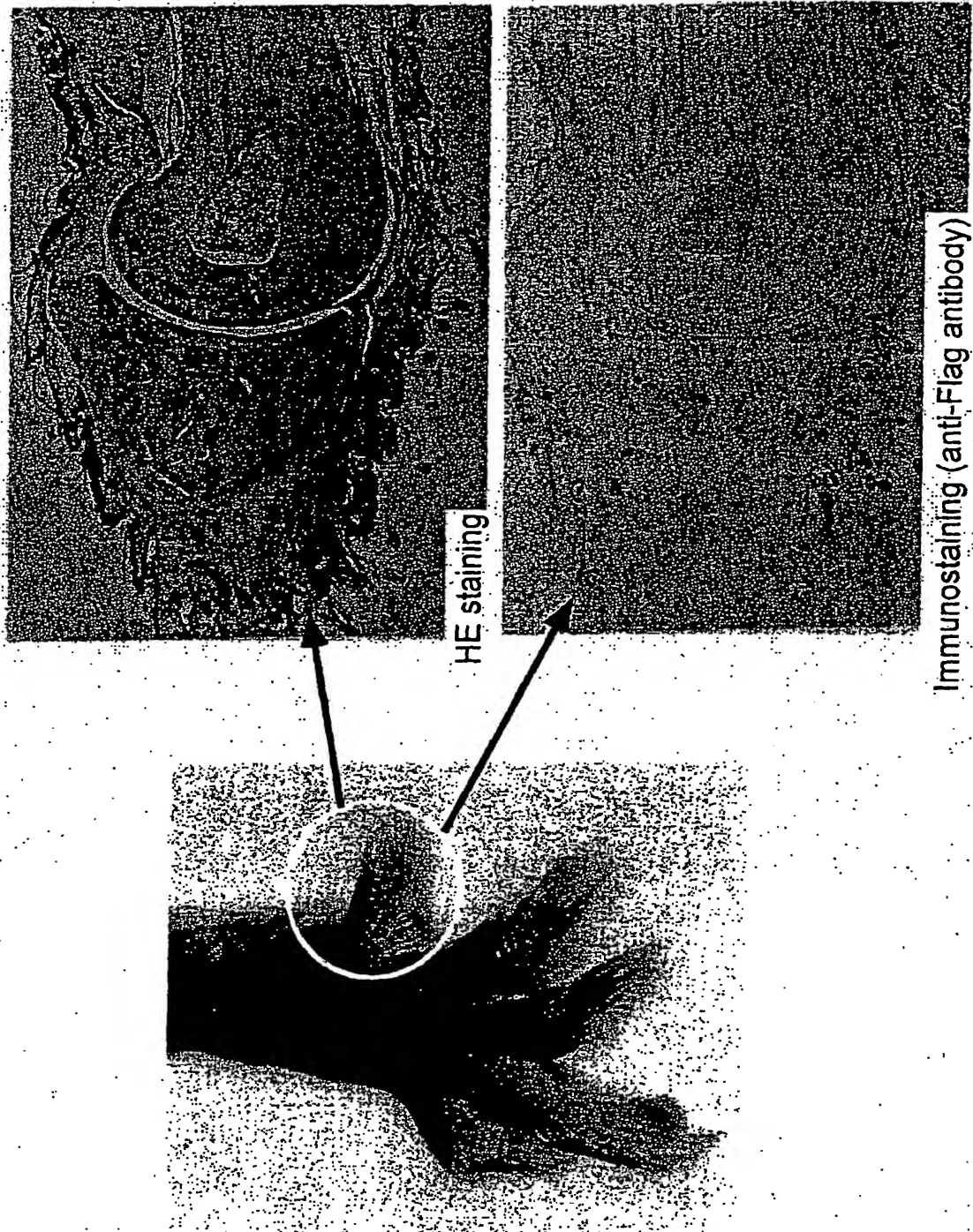




Figure 18

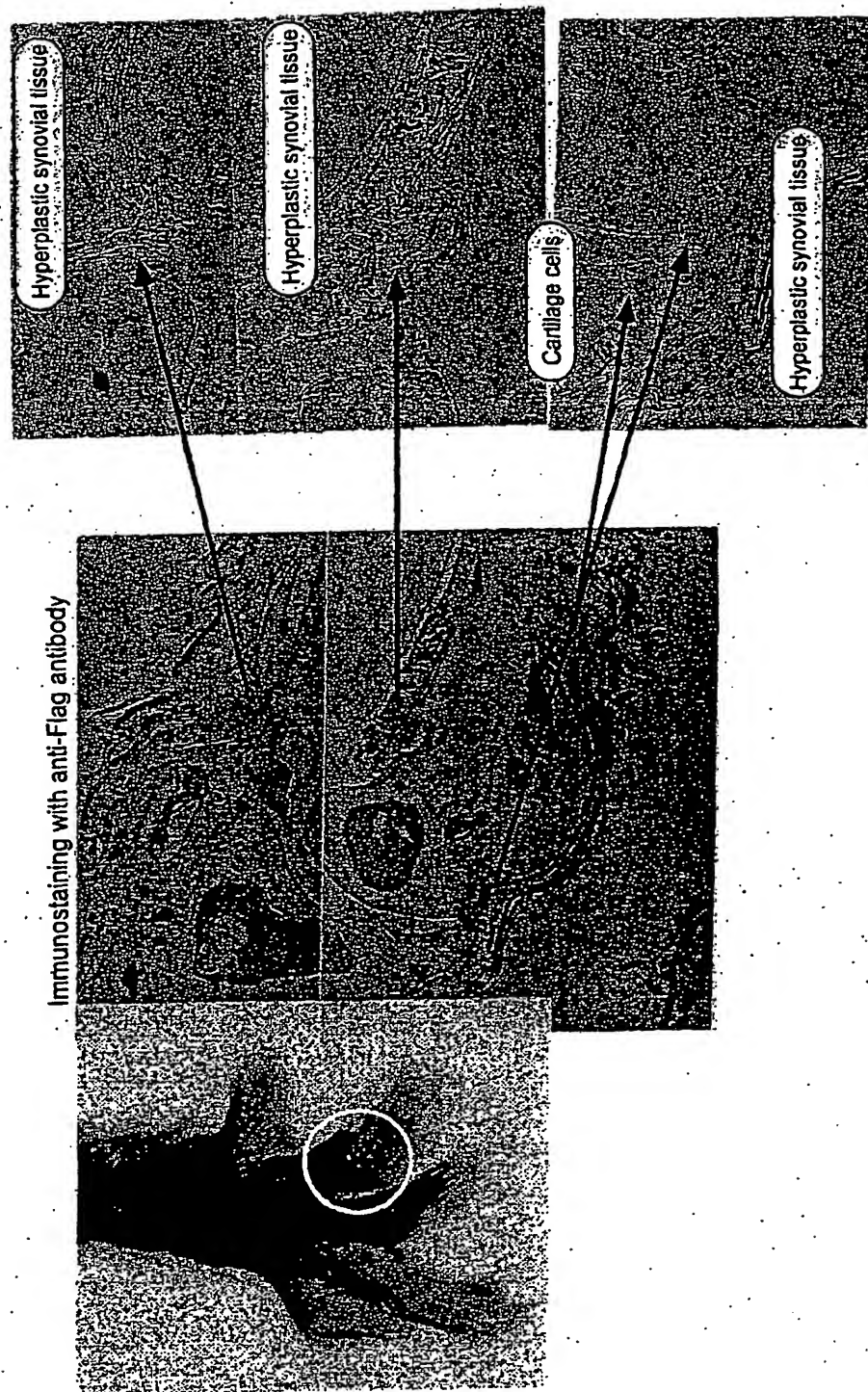


Figure 19

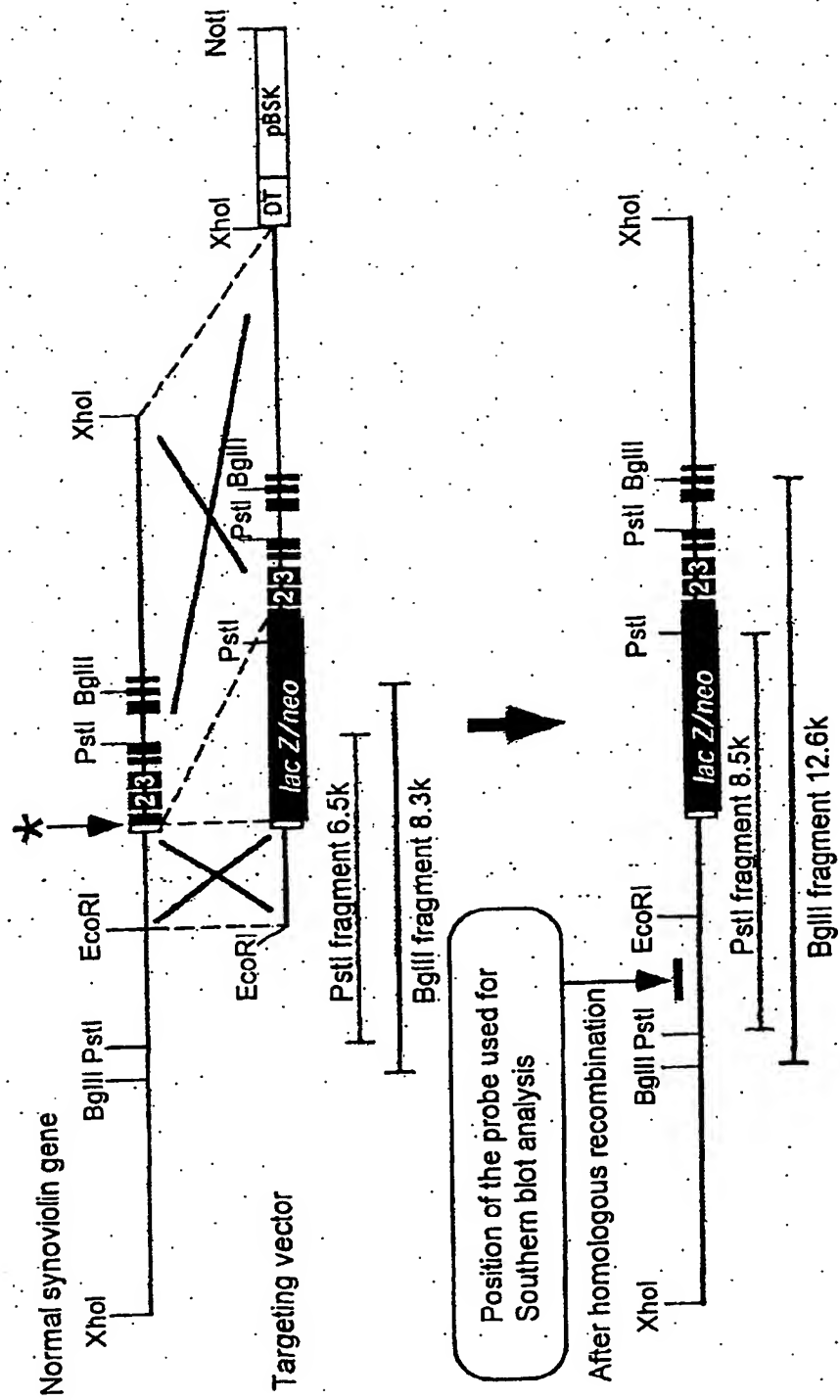


Figure 20

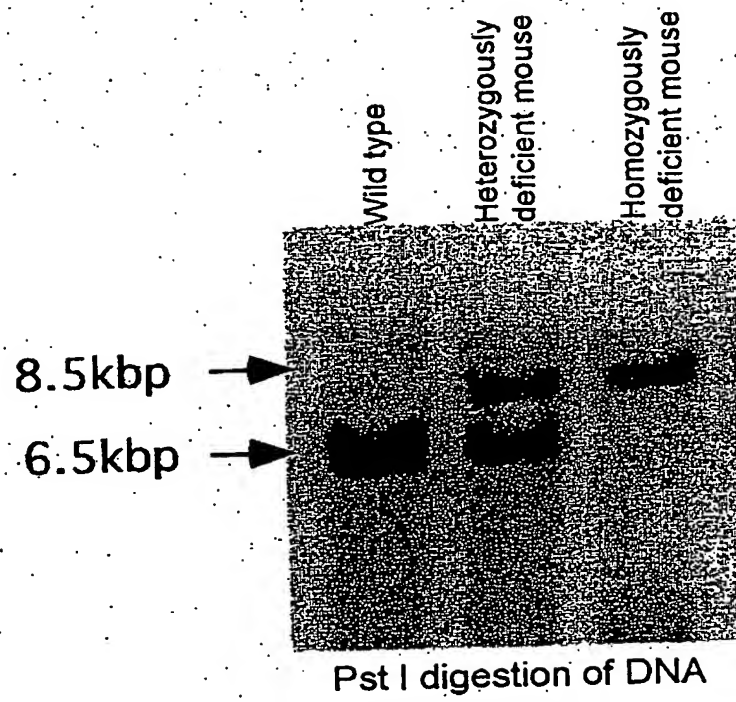


Figure 21

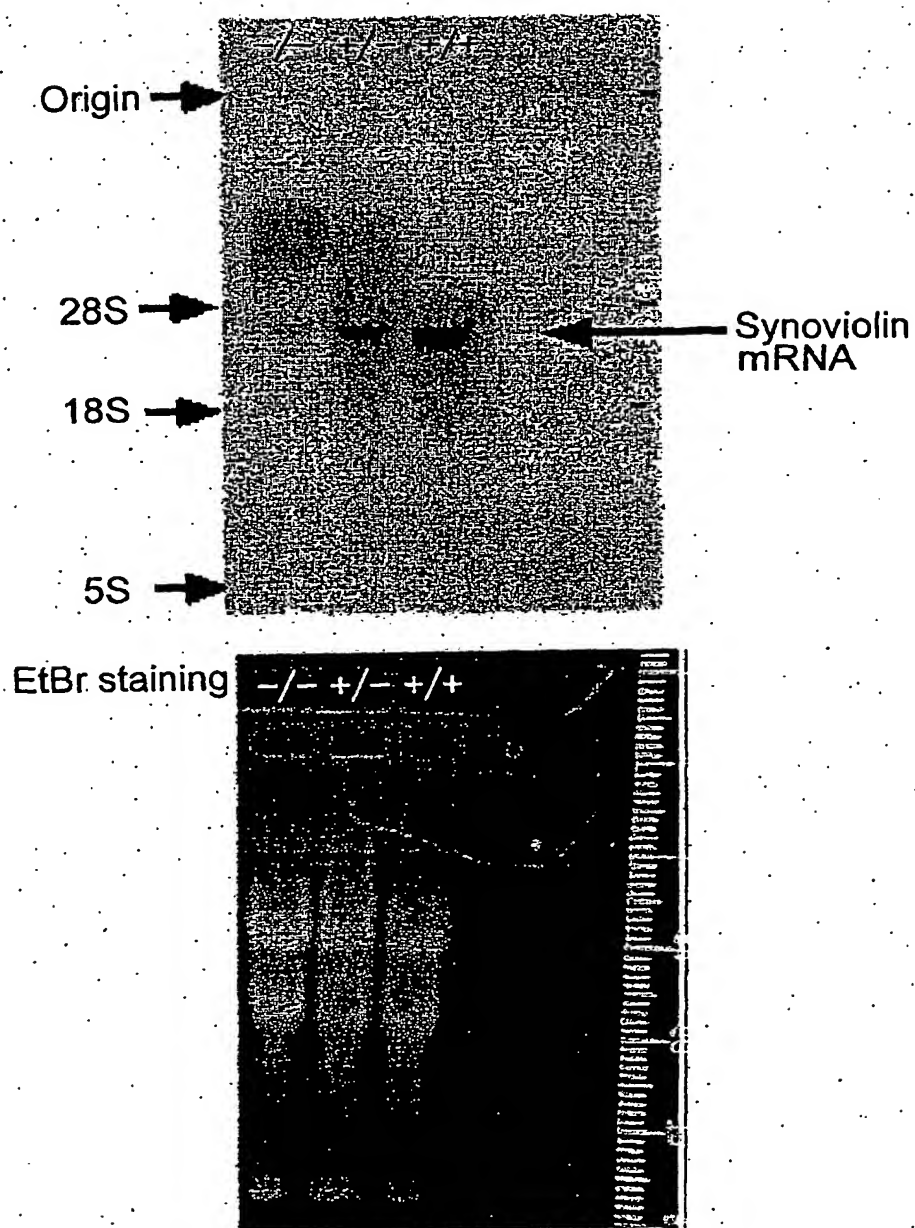


Figure 22

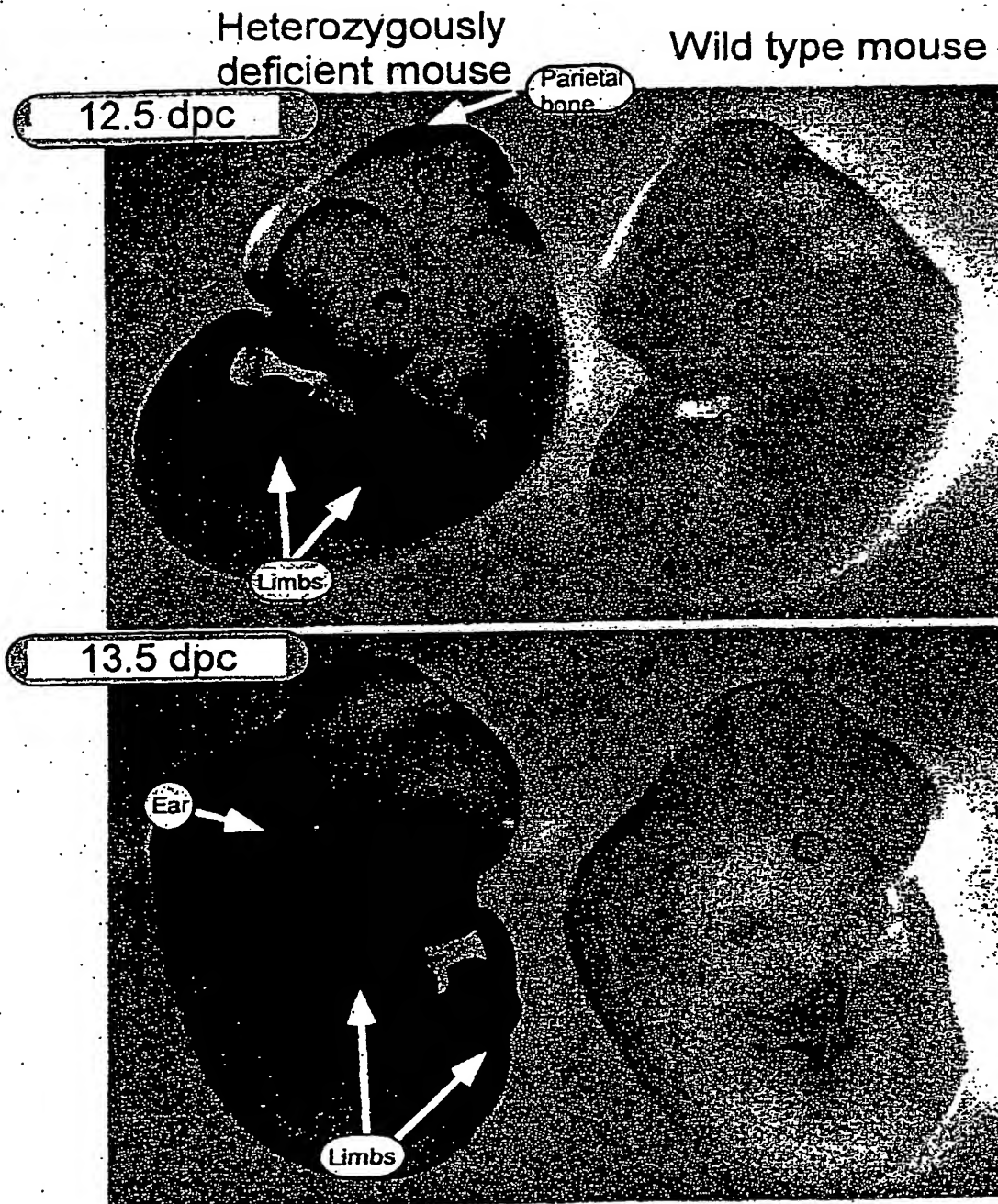


Figure 23

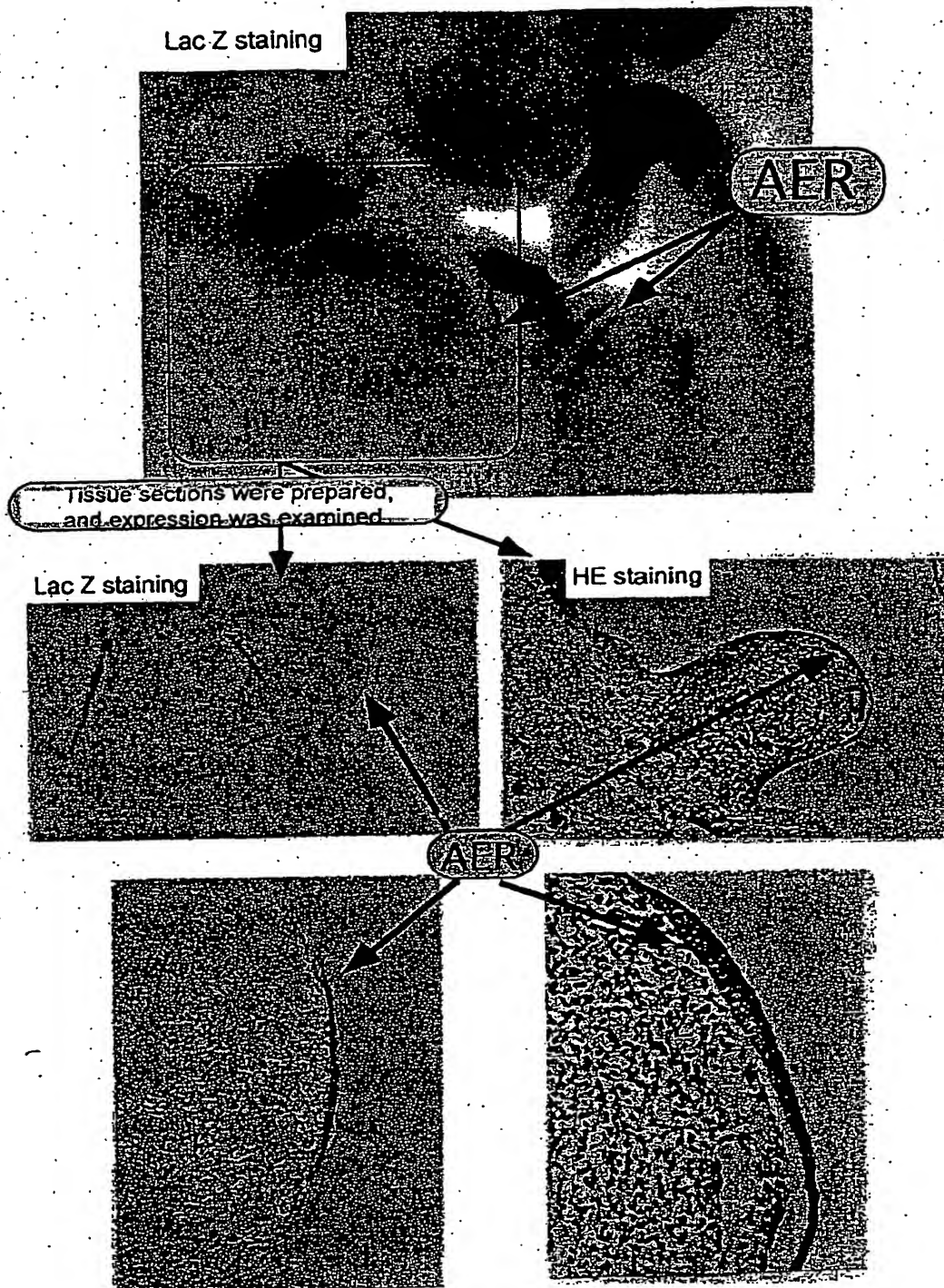


Figure 24

Heterozygote x40

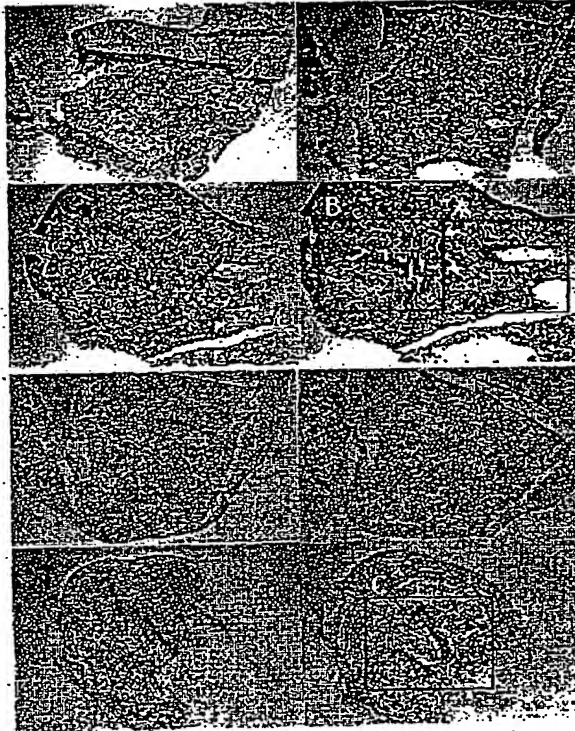


Figure 25

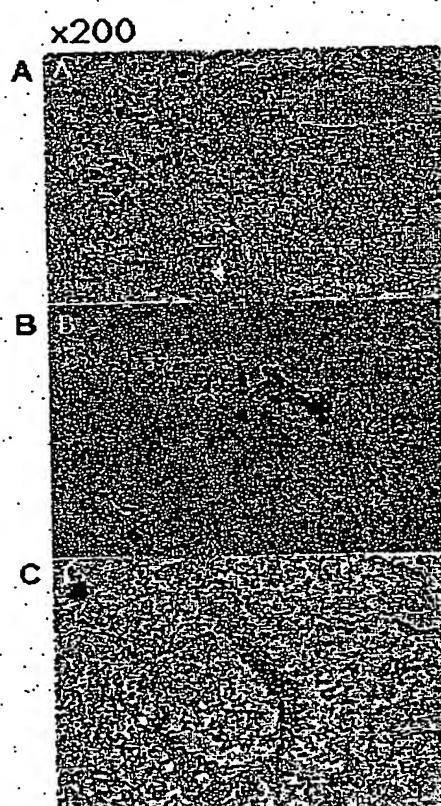




Figure 26

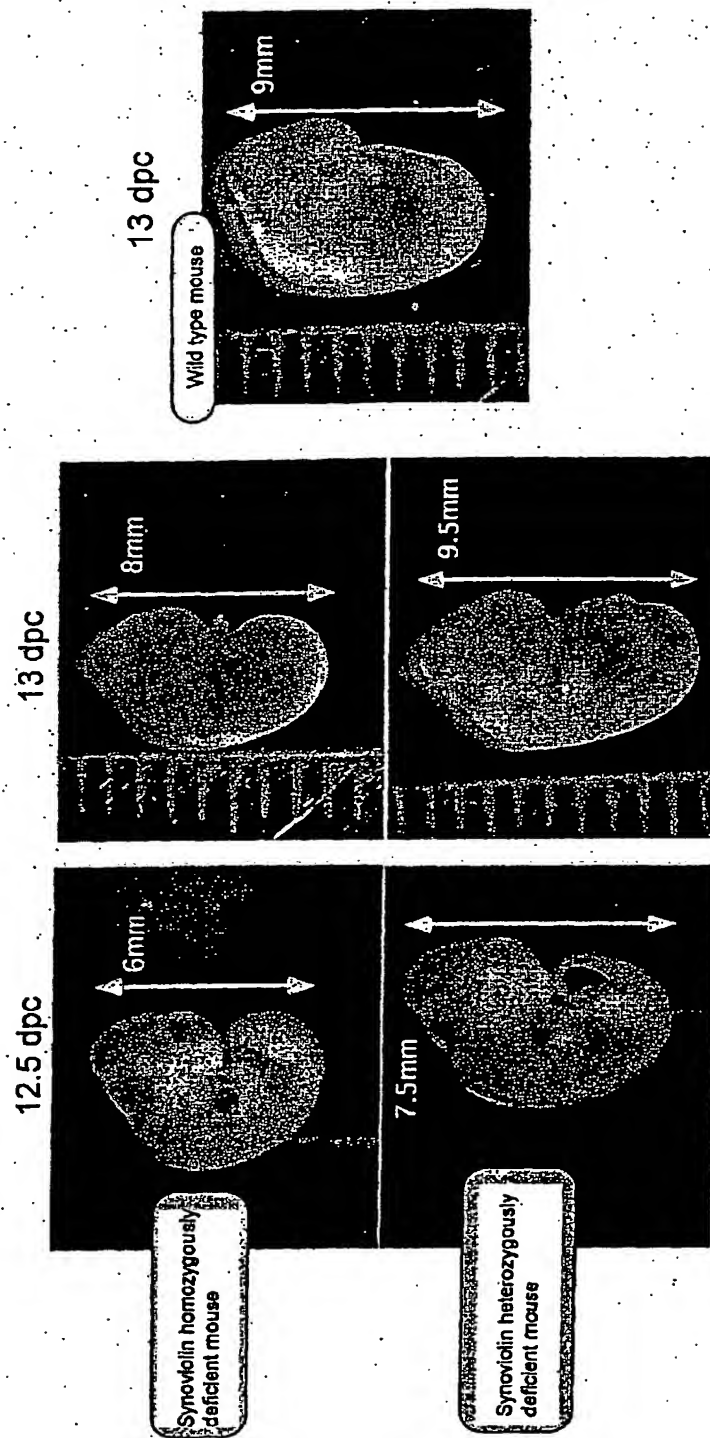


Figure 27

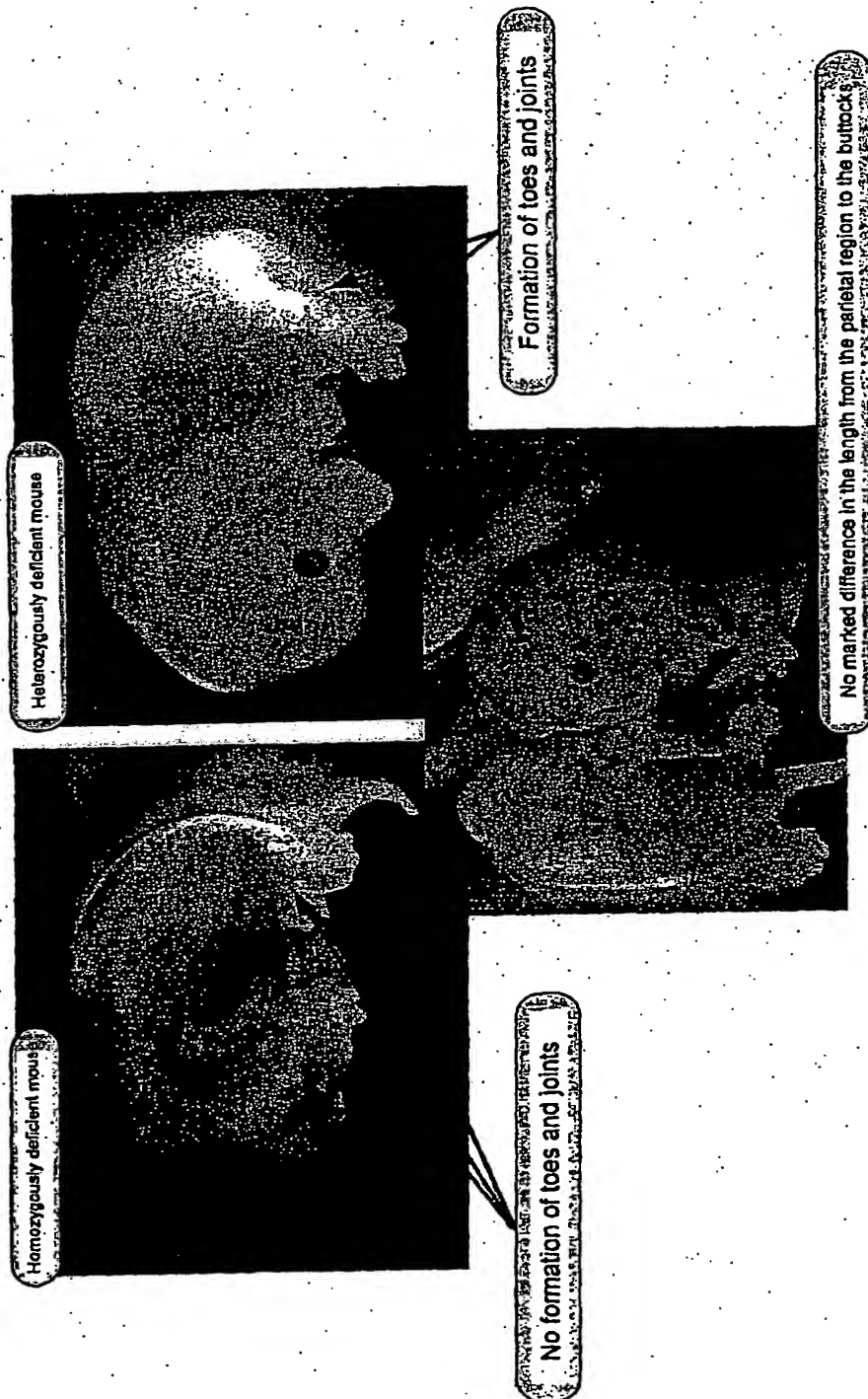


Figure 28

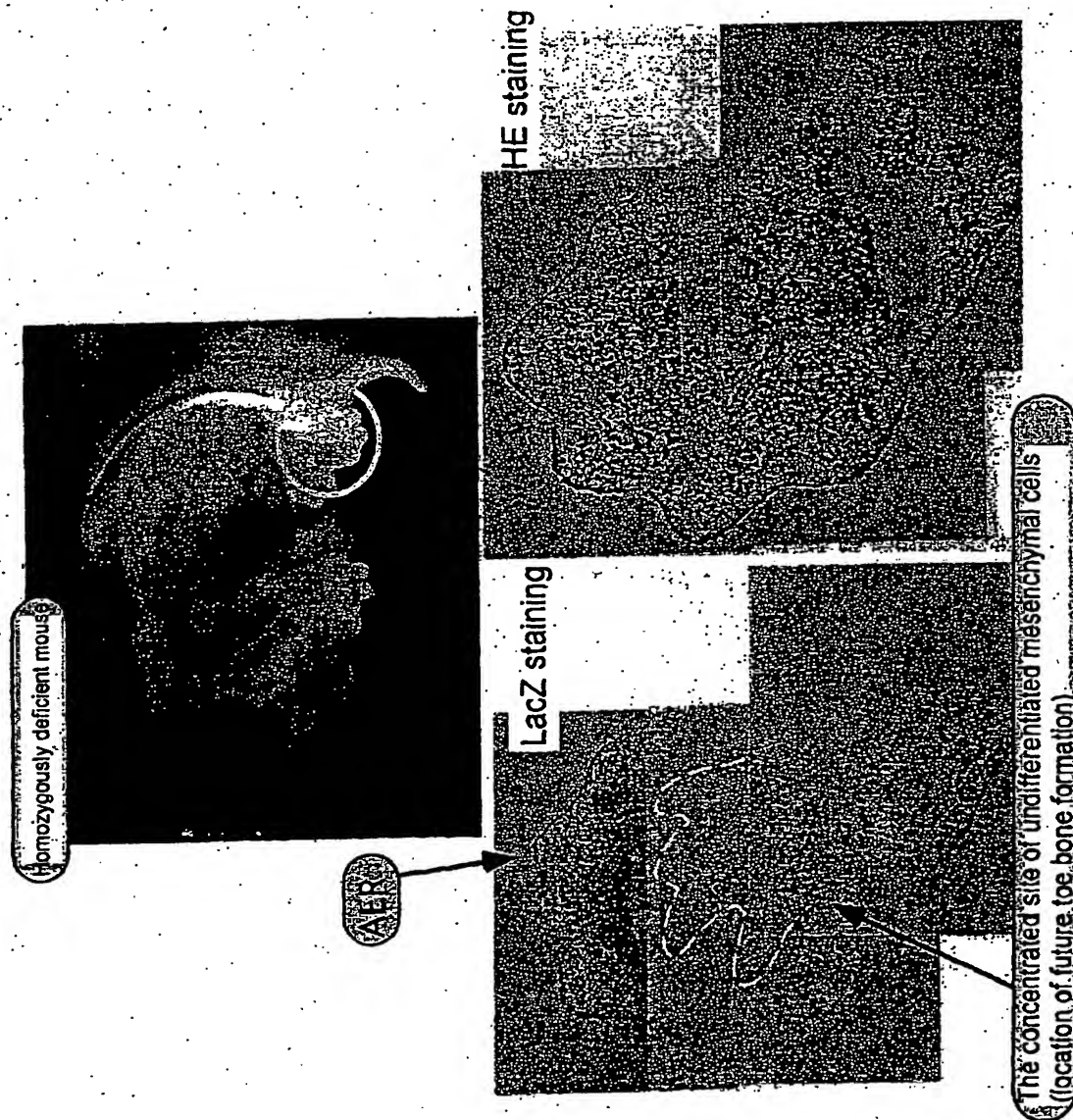


Figure 29

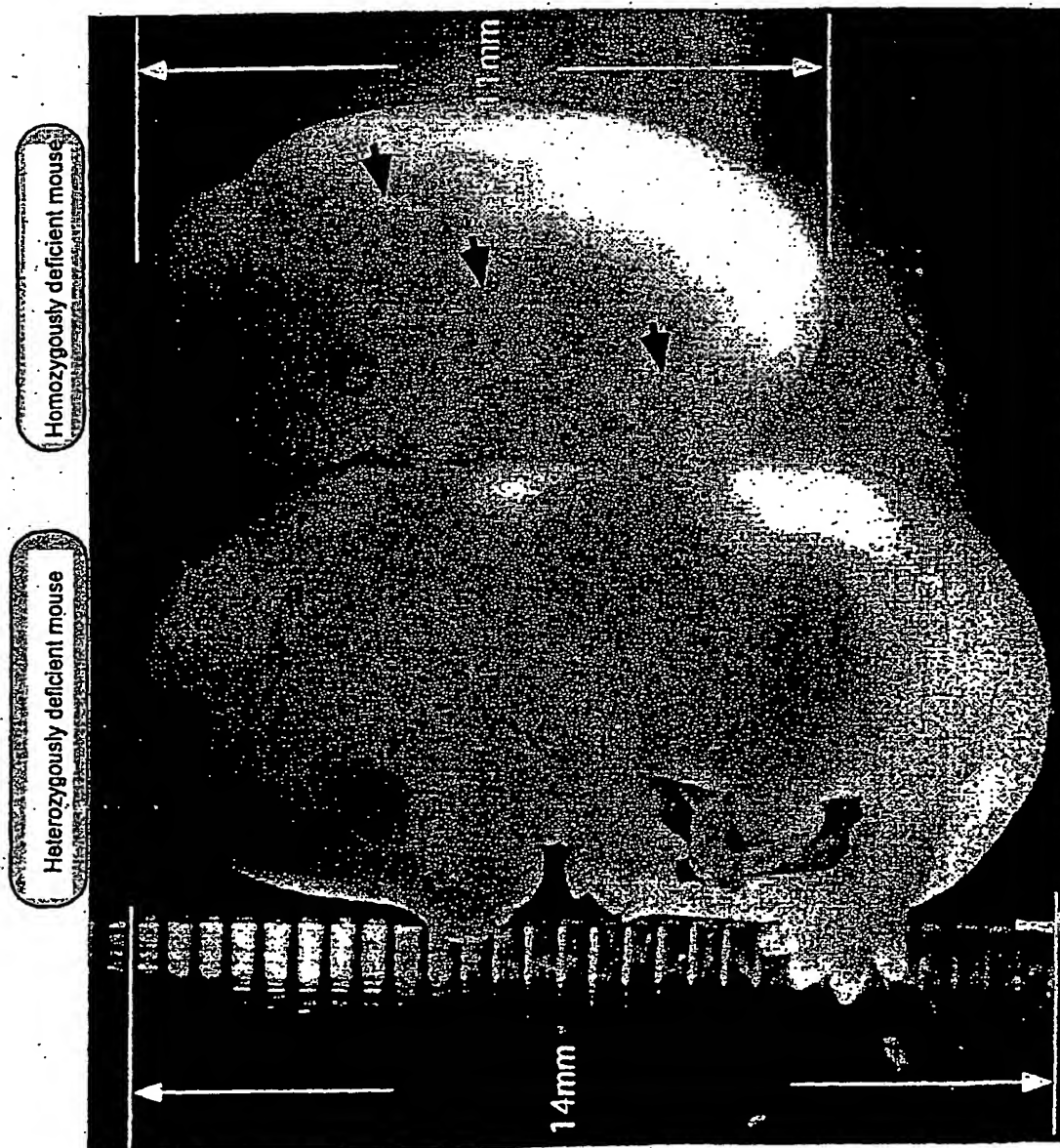


Figure 30

Alcian blue and Alizarin red staining

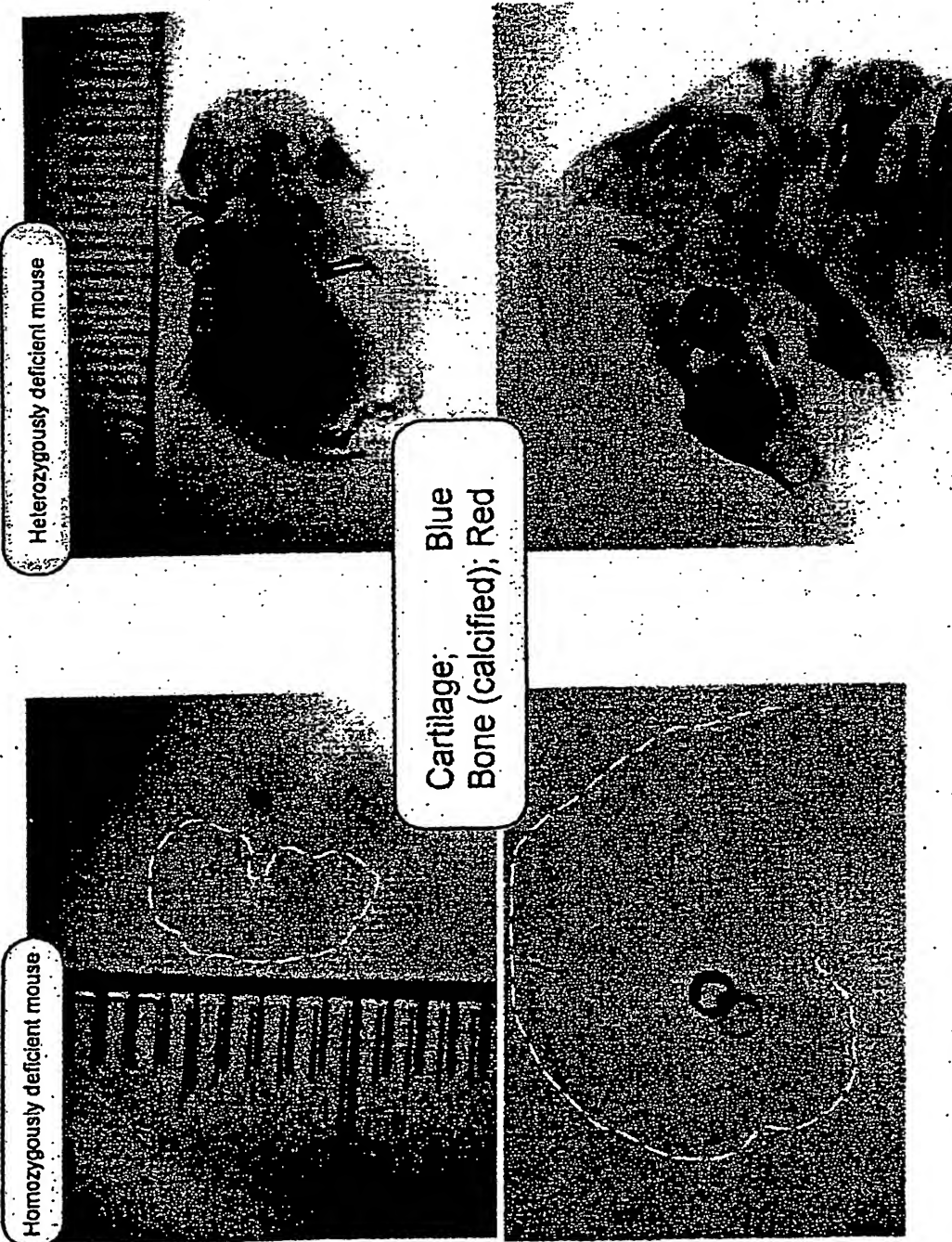


Figure 31

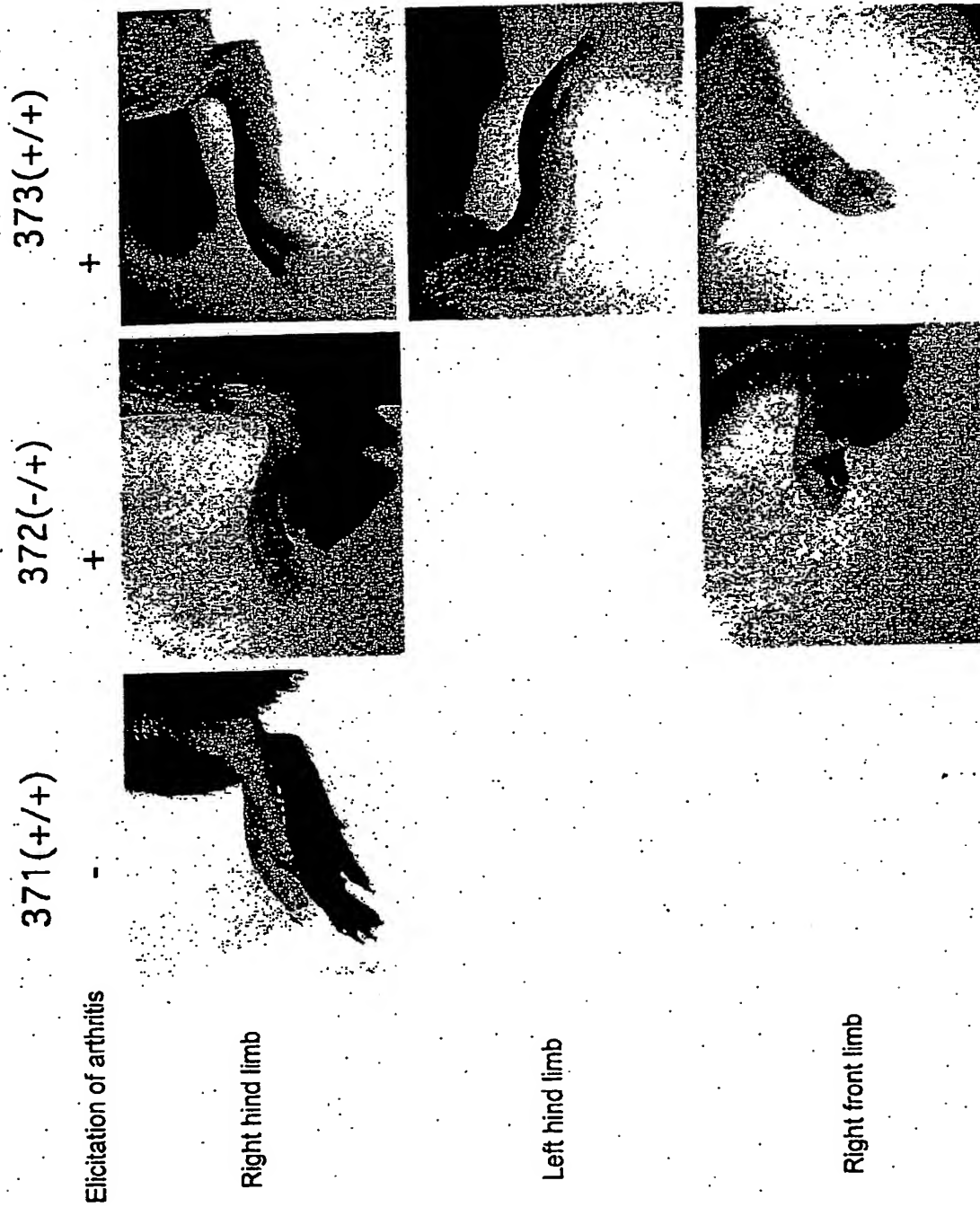


Figure 32

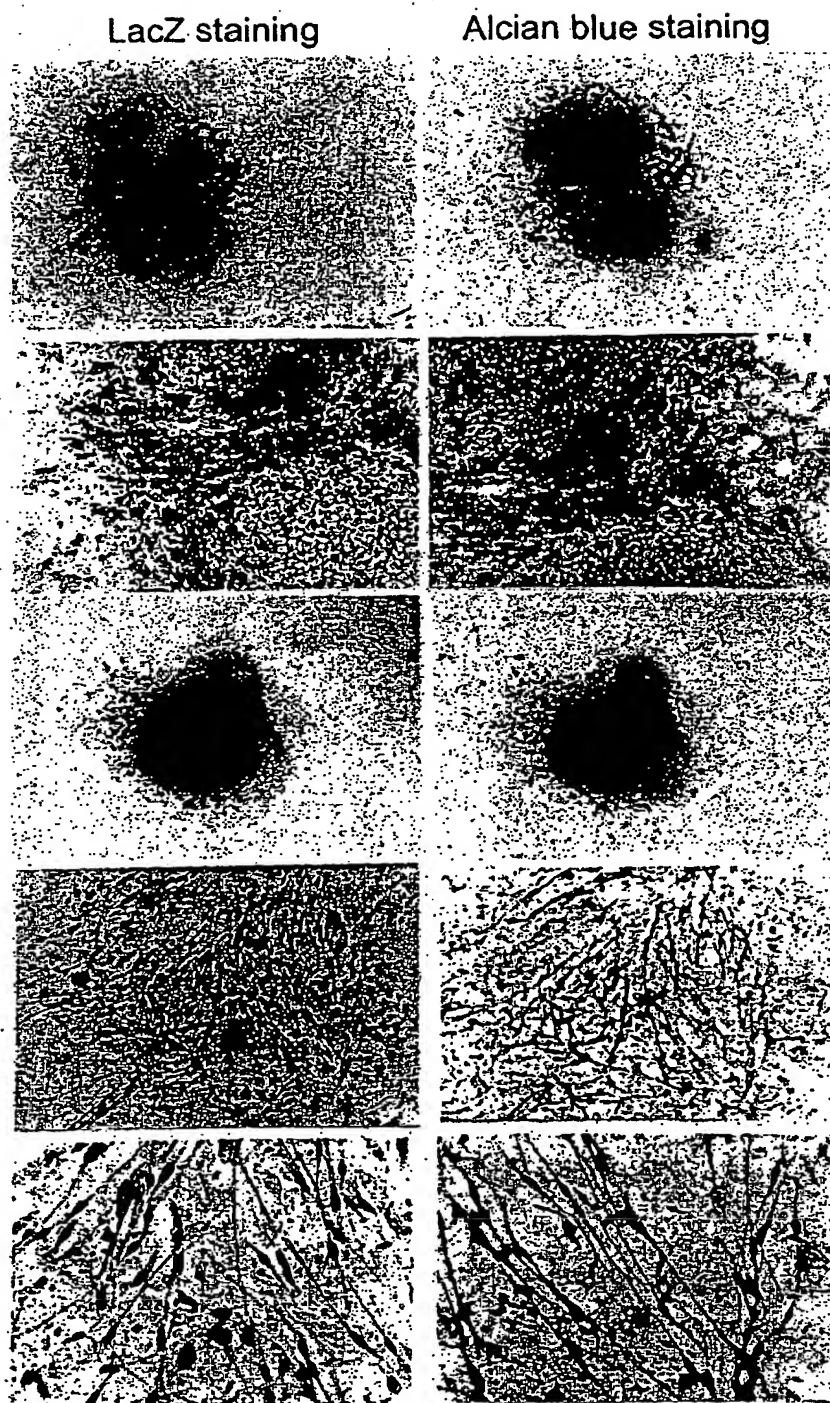




Figure 33

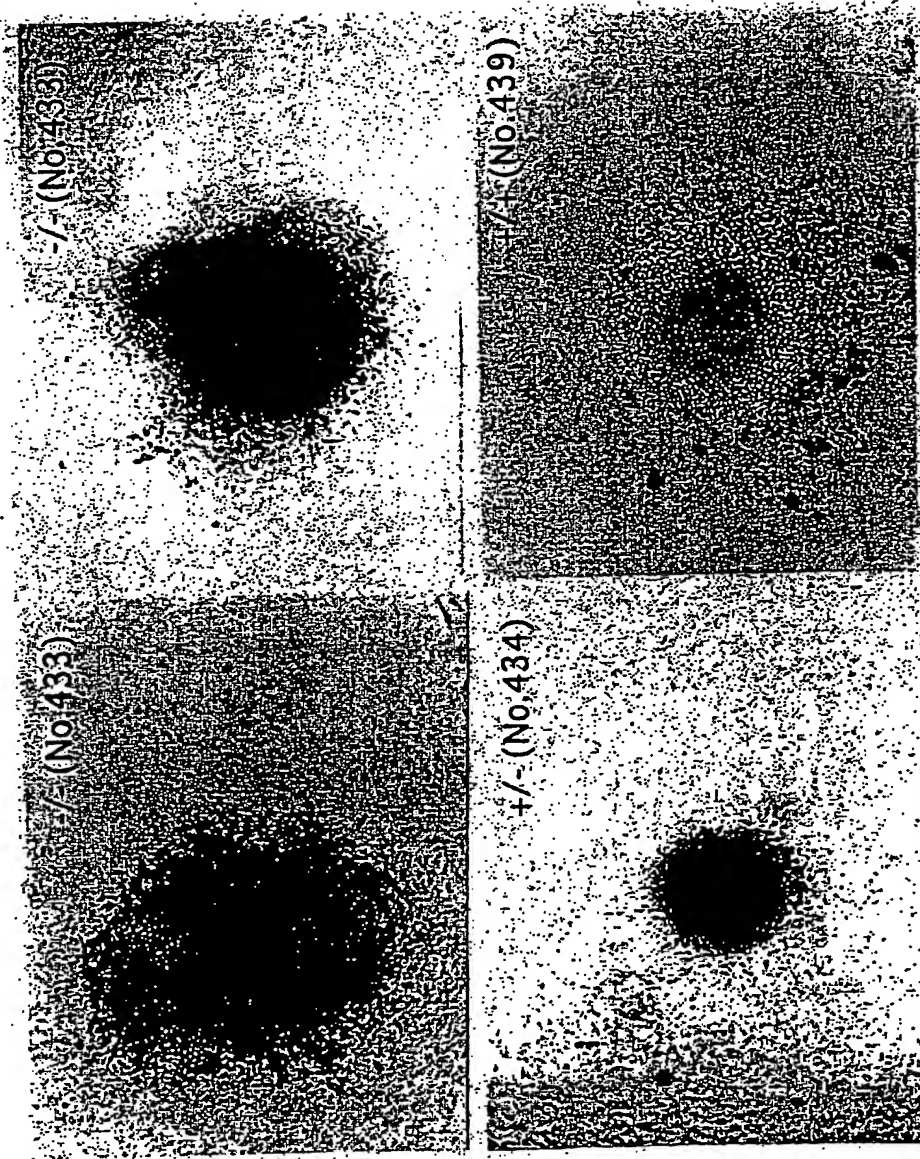




Figure 34

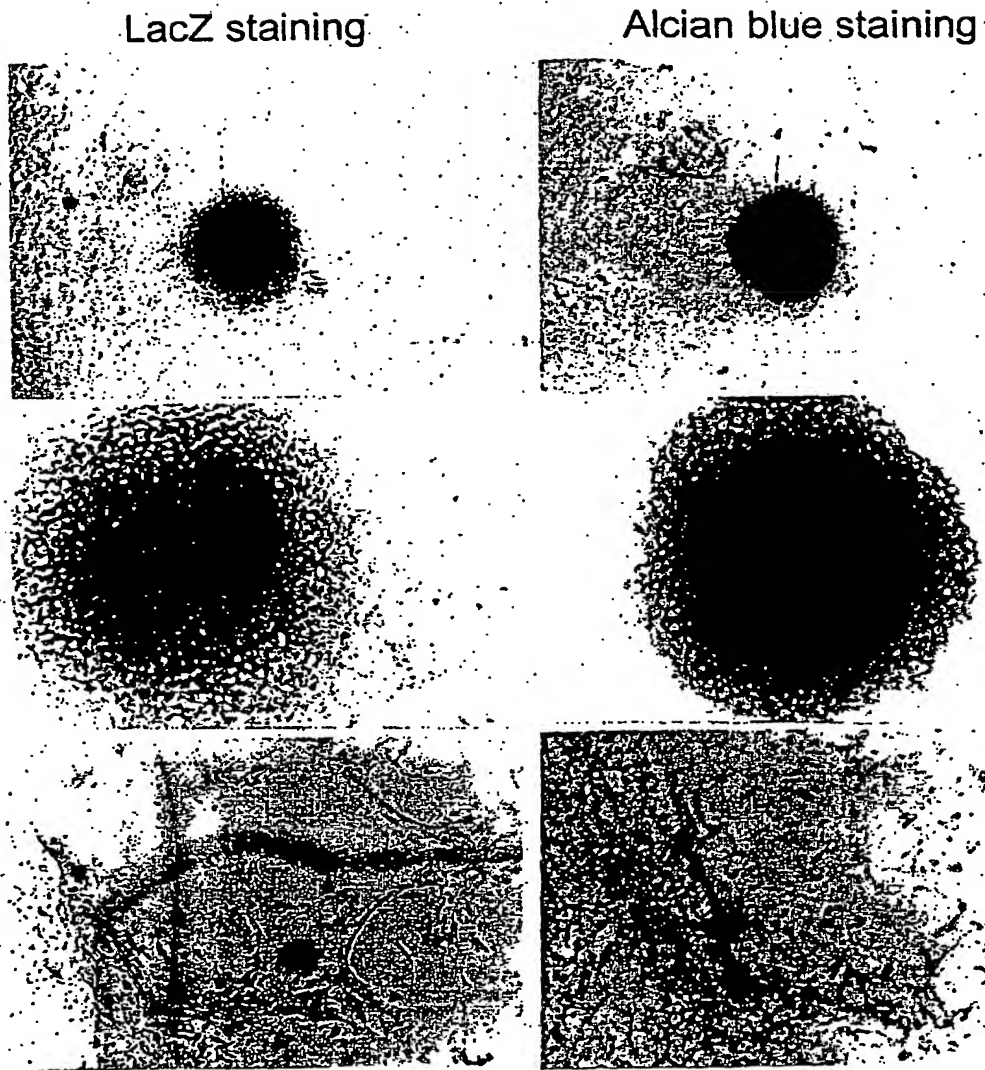


Figure 35

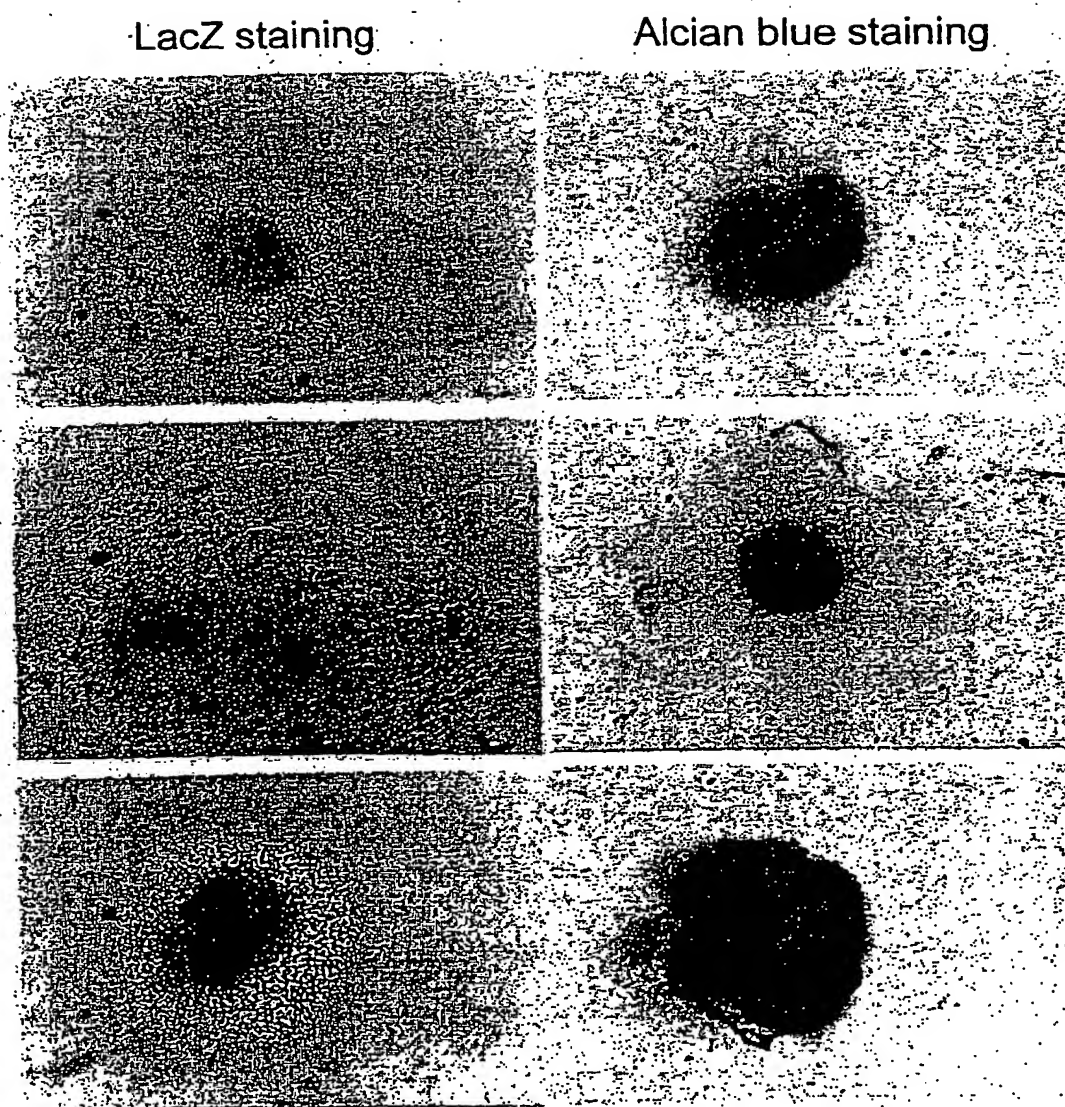


Figure 36

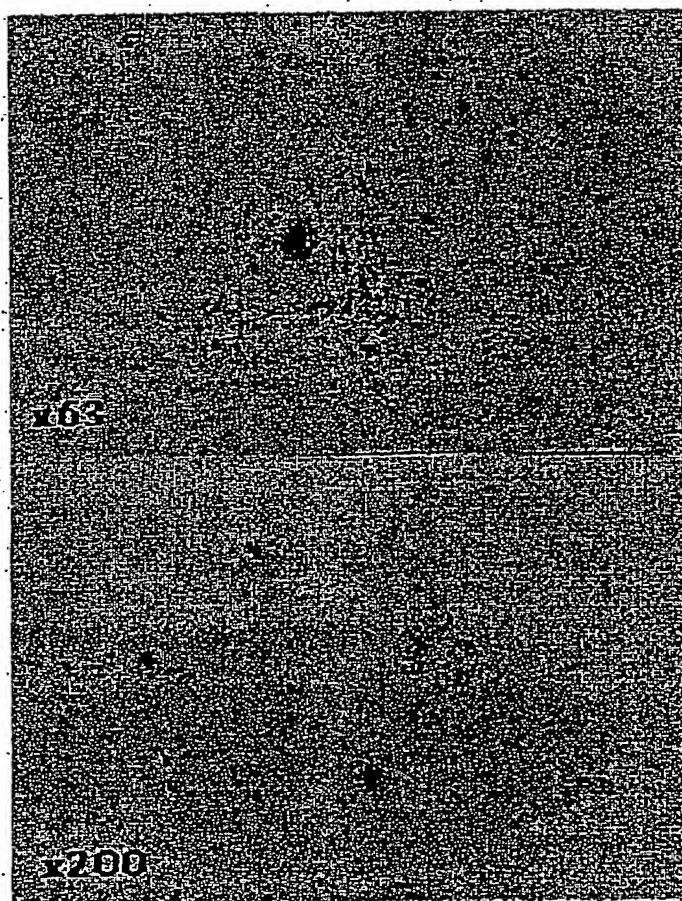


Figure 37

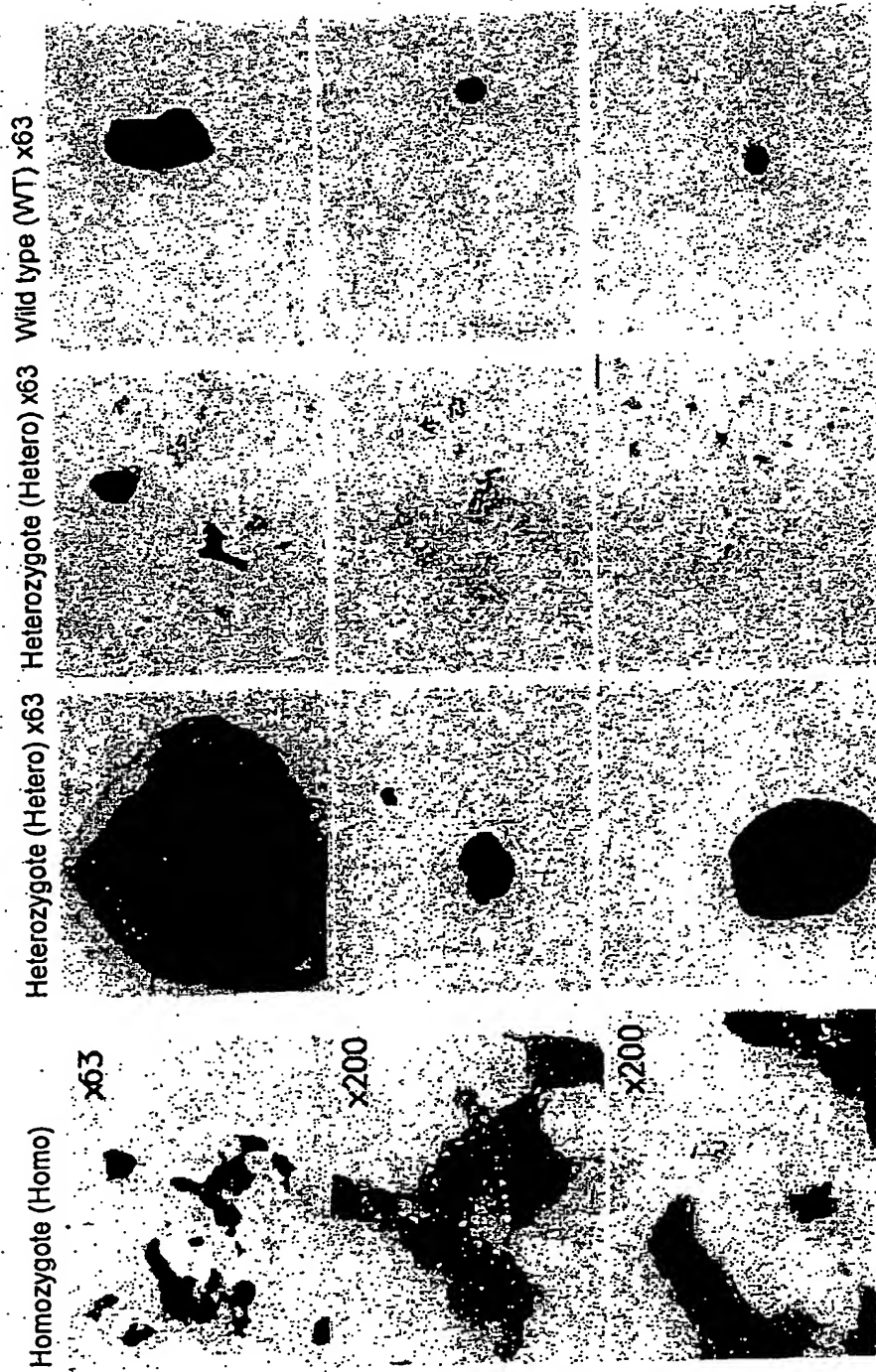
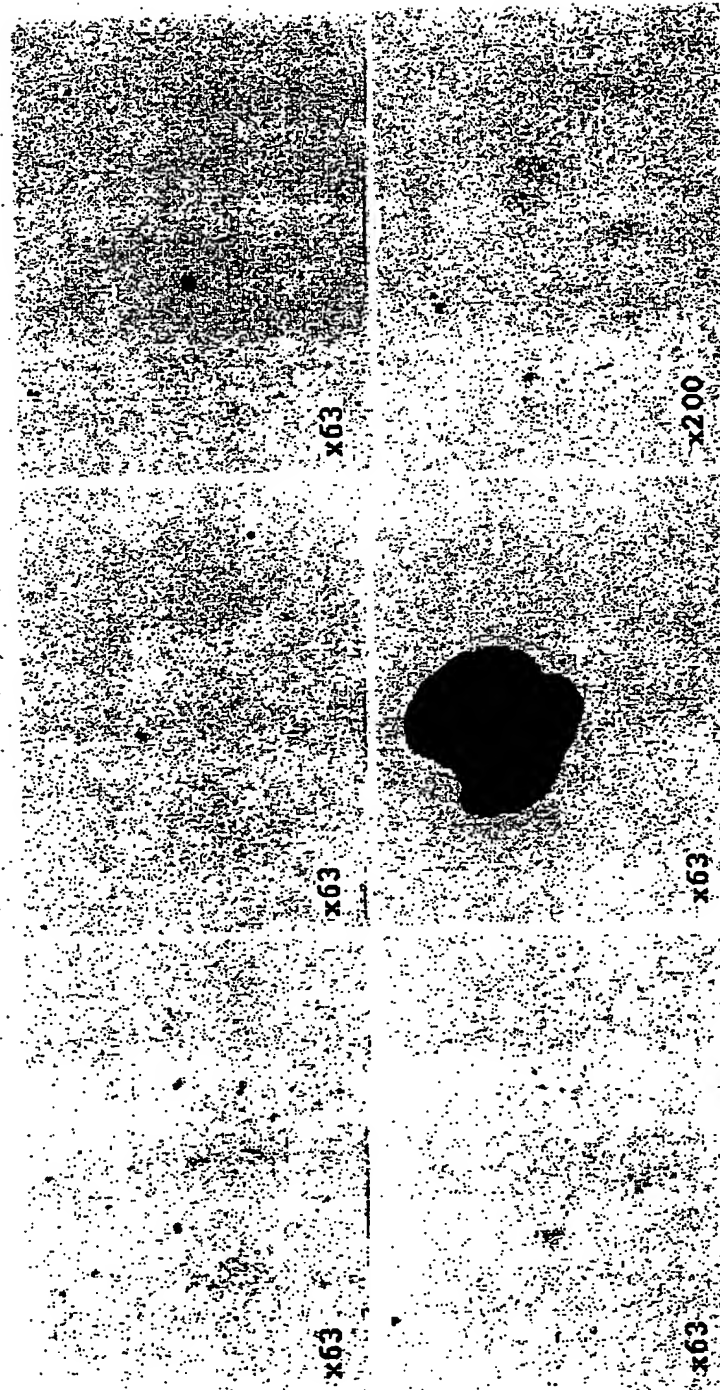


Figure 38



Condition; subconfluent

Figure 39

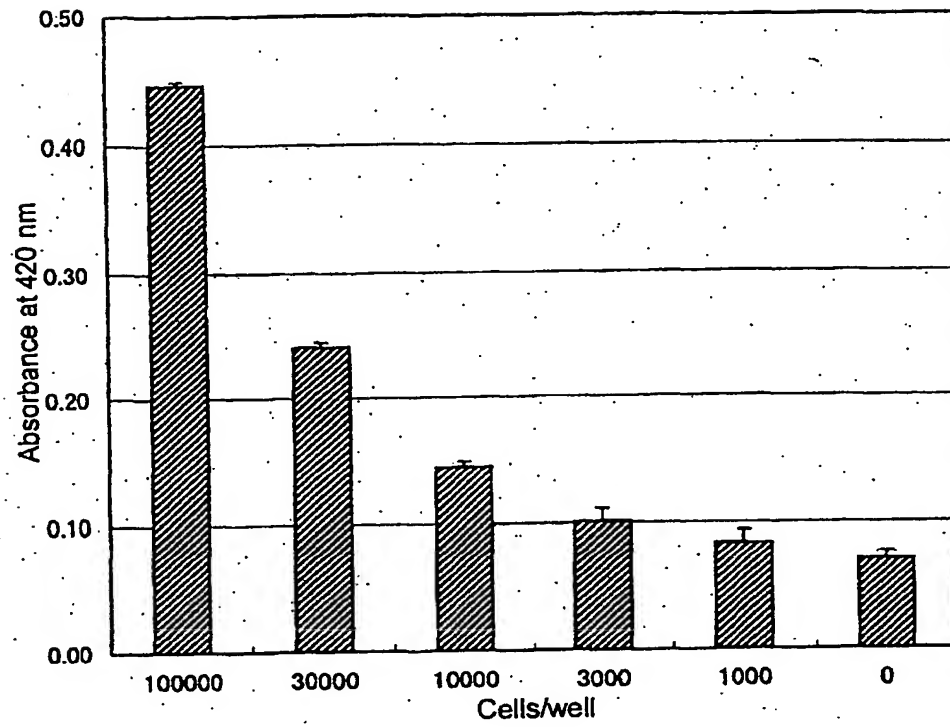


Figure 40

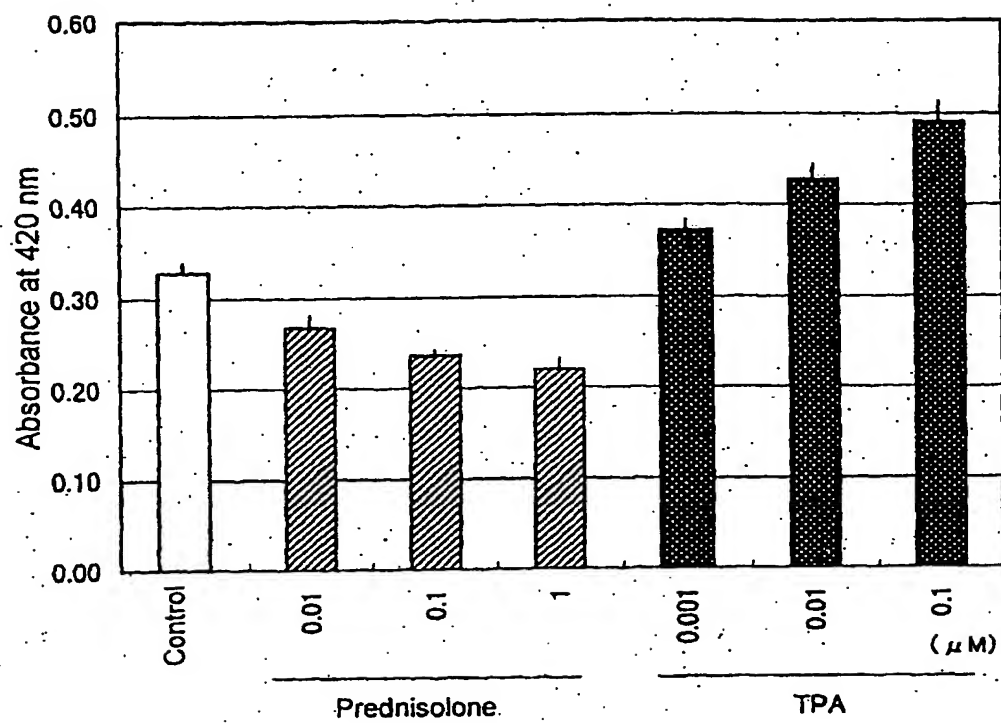


Figure 41

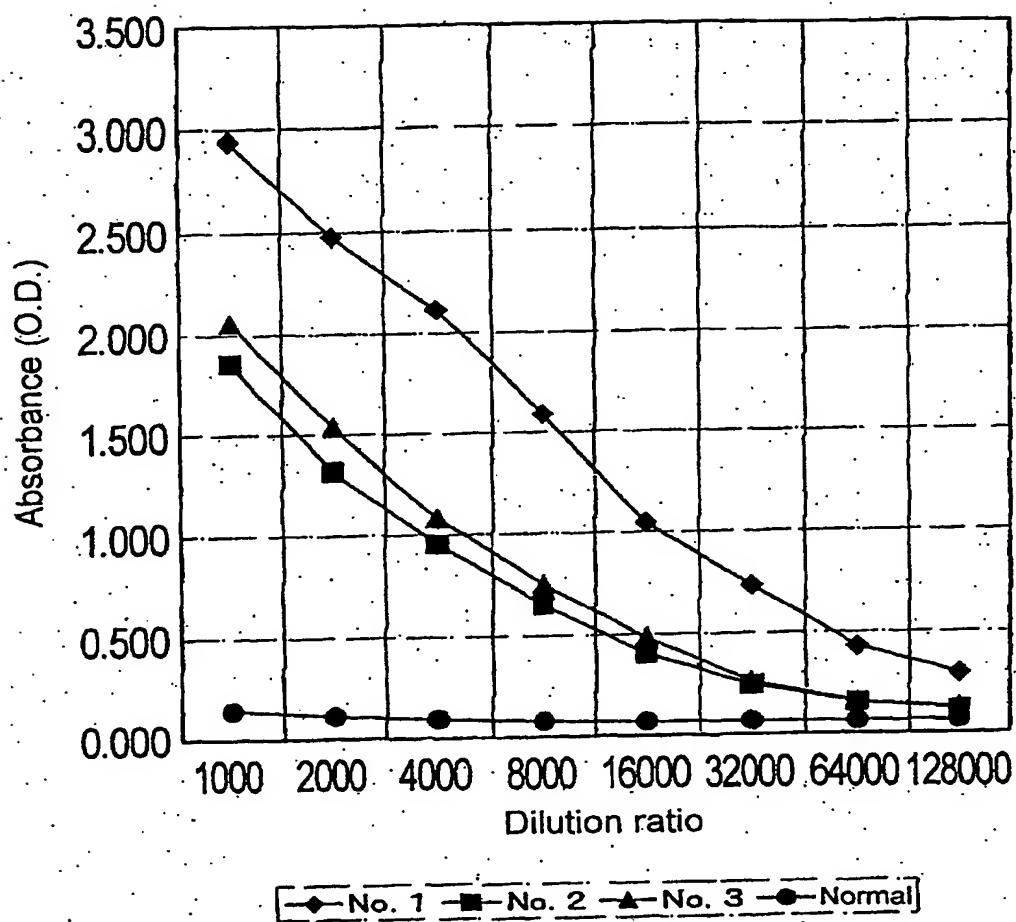




Figure 42

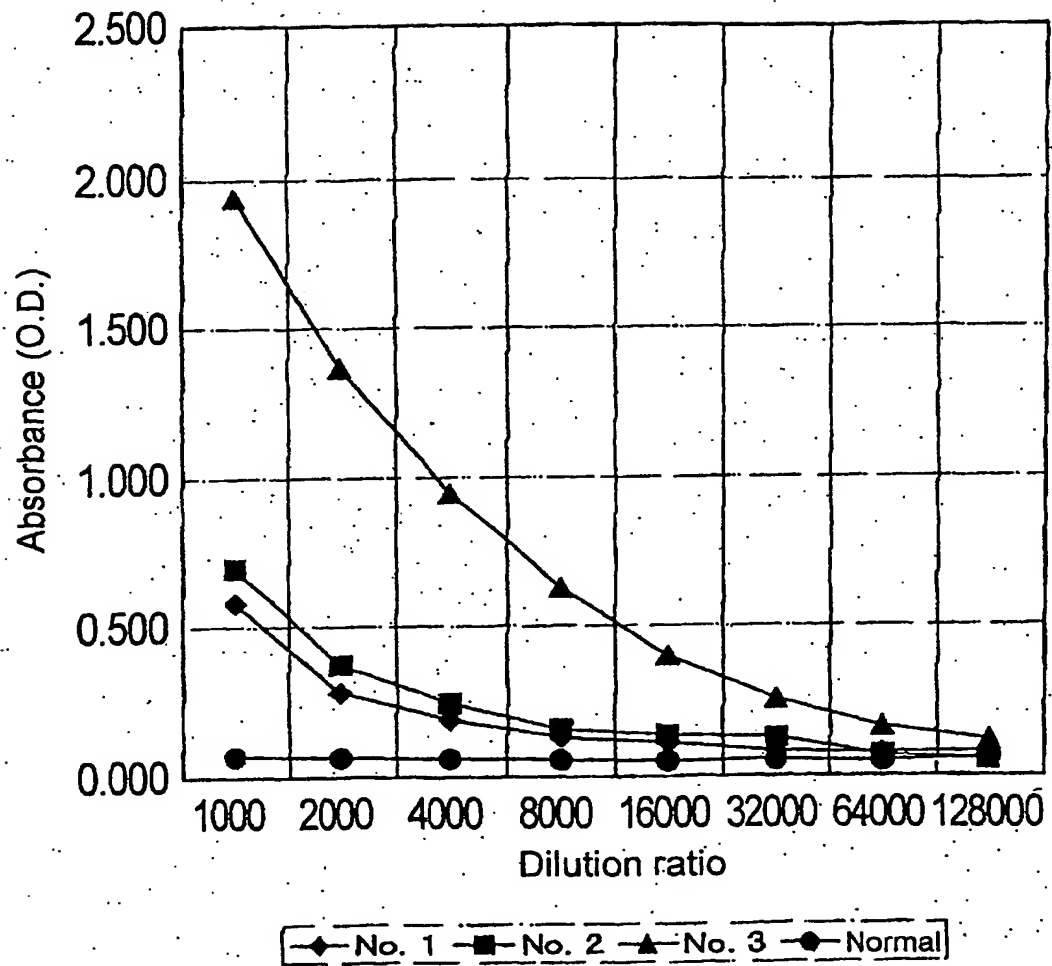


Figure 43

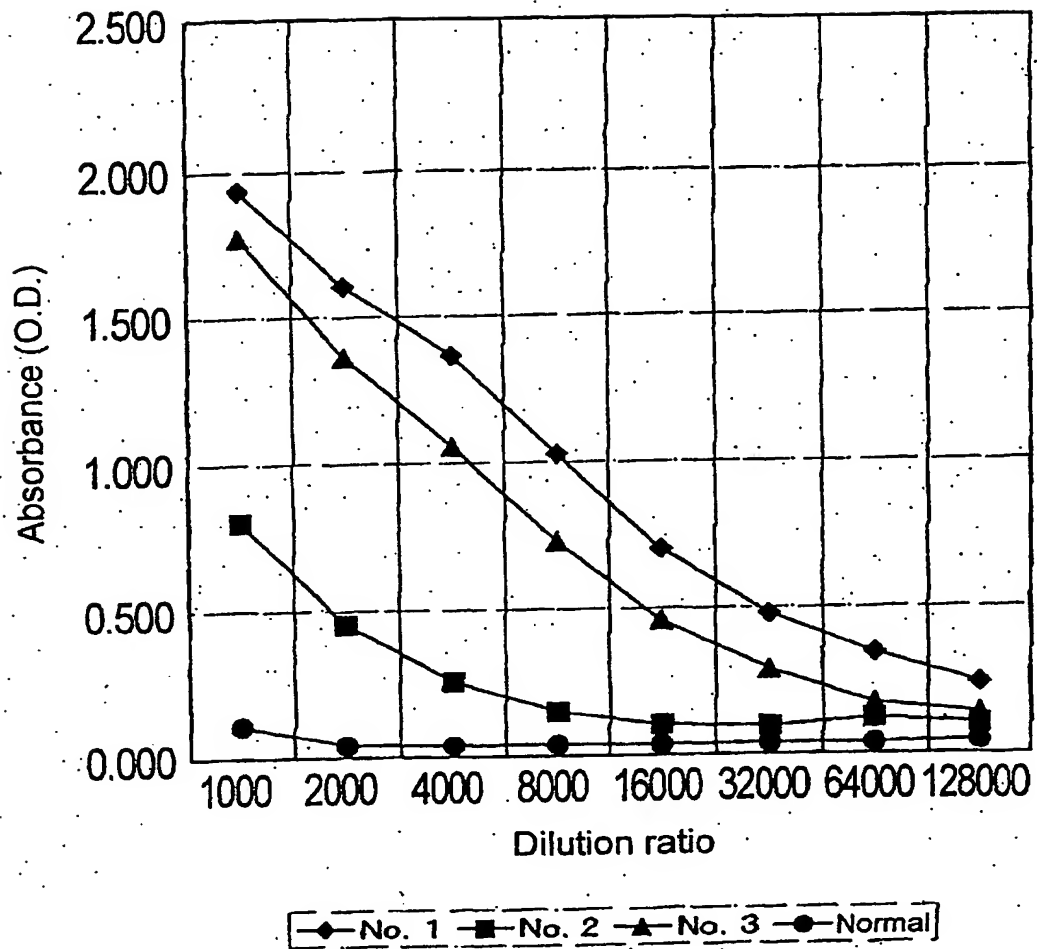


Figure 44

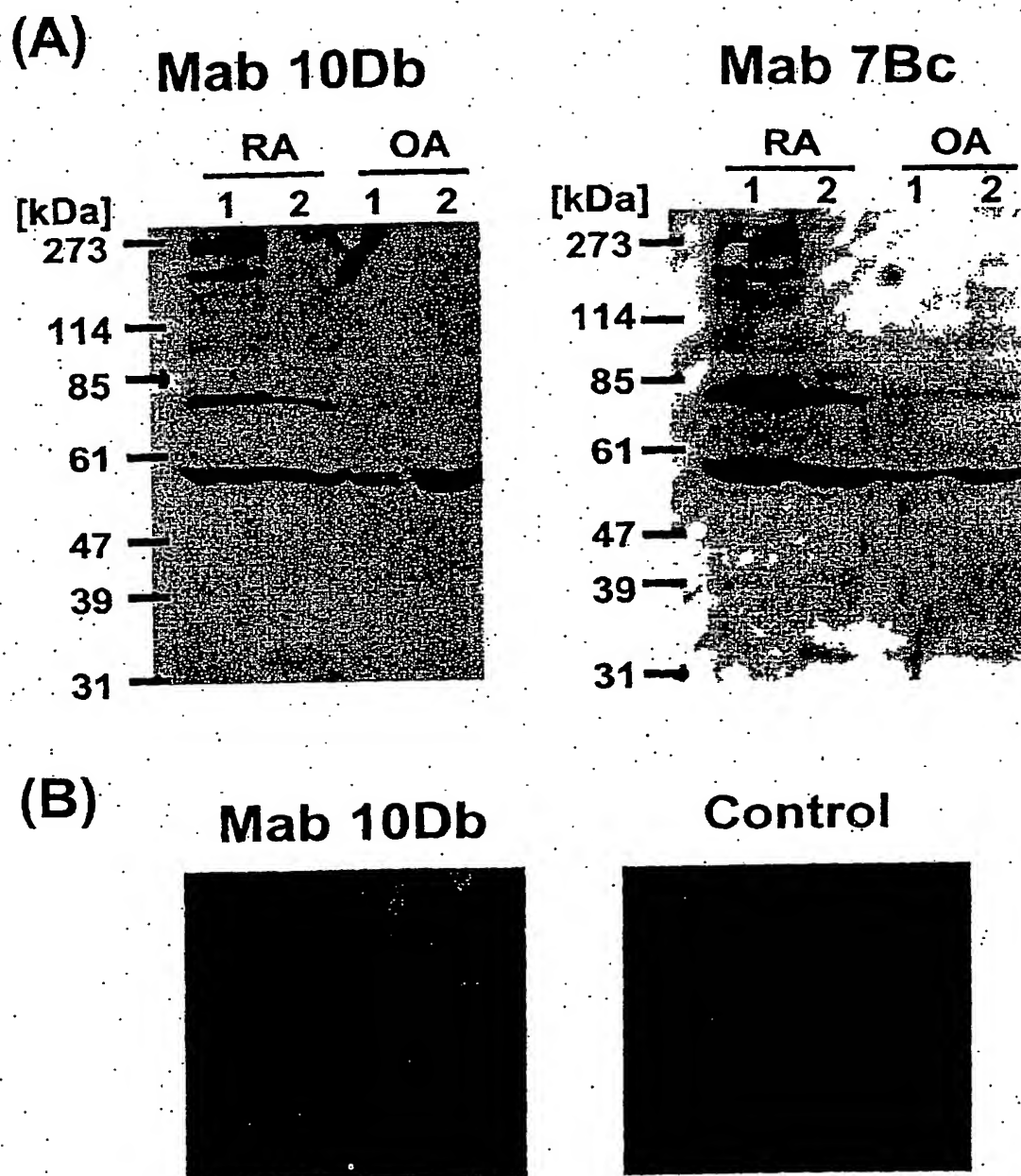


Figure 45

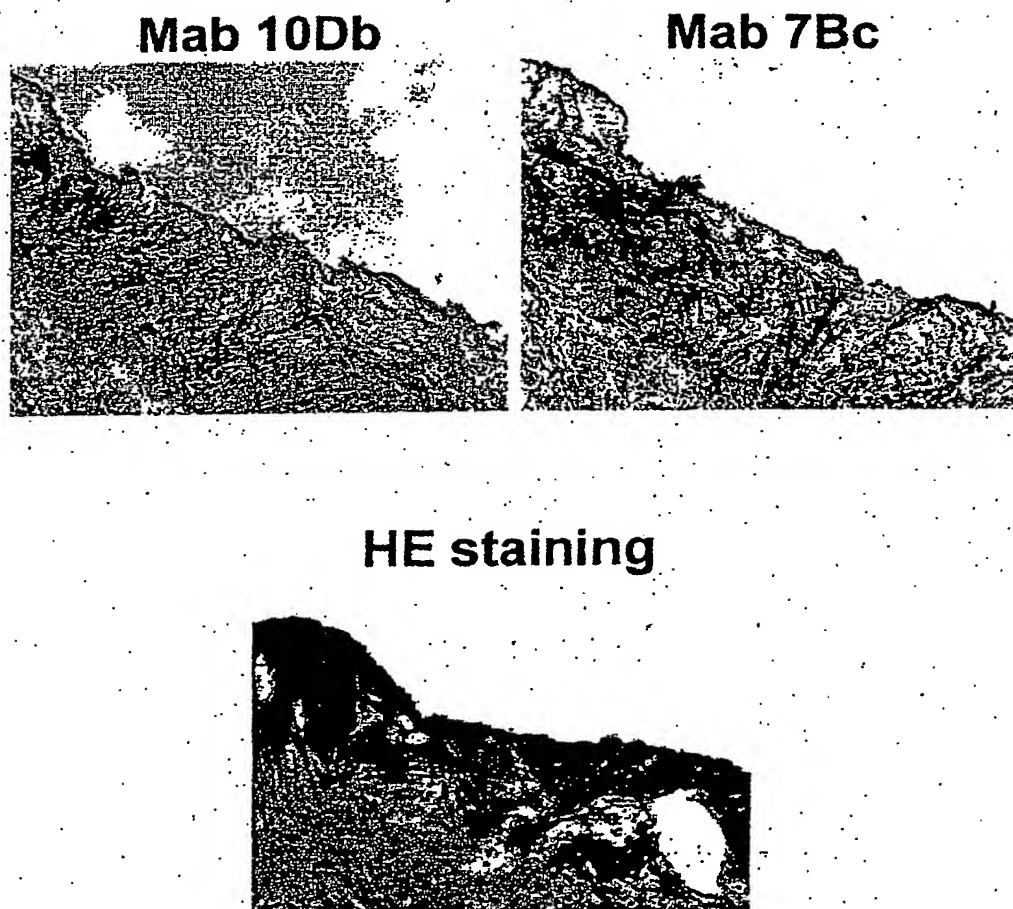
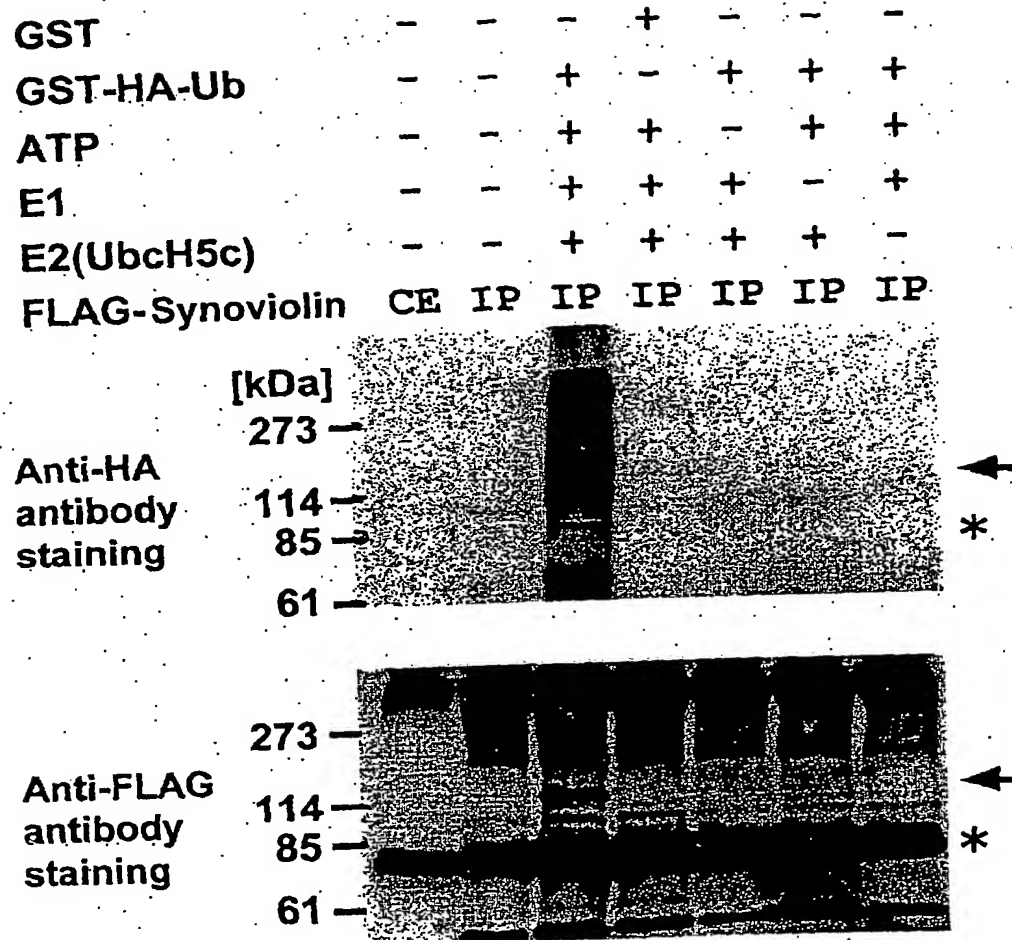


Figure 46



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. <sup>7</sup> C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl. <sup>7</sup> C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
JICST FILE (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/45437 A (Genetics Institute, Inc.),	2, 3
A	15 October, 1998 (15.10.1998), & EP 973899 A2 & JP 2001-518793 A	1, 4-7
A	Minako NAKAZAWA et al., "Katsu-maku Saibou Kassei-ka ni okeru CBP no Yakuwari", Rinshou Men-eki, March, 2000, Vol.33, No.2, pages 261 to 264	1-48
A	Beata LECKA-CZERNIK et al., "An Overexpressed Gene Transcript in Senescent and Quiescent Human Fibroblasts Encoding a Novel Protein in the Epidermal Growth Factor-Like Repeat Family Stimulates DNA Synthesis", Molecular and Cellular Biology, January, 1995, Vol.15, No.1, pages 120 to 128	29
A	Elise HCON et al., "Linkage of Autosomal Dominant Radial Drusen (Malattia Leventinese) to Chromosome 2p16-21", Arch Ophthalmol., February, 1996, Vol.114, No.2, pages 193 to 198	29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 February, 2002 (13.02.02)		Date of mailing of the international search report 26 February, 2002 (26.02.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11289

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shiro Ikegawa et al., "Structure and Chromosomal Assignment of the Human S1-5 Gene (FBNL) That Is Homologous to Fibrillin", Genomics, May, 1996, Vol.35, No.3, pages 590 to 592	29

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 7 月 4 日 (04.07.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/052007 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, 5/10, 1/21, 1/15, 1/19, C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/68 (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島 利博 (NAKA-JIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒224-0001 神奈川県 横浜市 都筑区 中川 1 丁目 2-5 港北ガーデンヒルズ A 棟 503 号室 Kanagawa (JP). 天野 徹也 (AMANO, Tetsuya) [JP/JP]; 〒214-0005 神奈川県 川崎市 多摩区 寺尾 台 1 丁目 21 番地 16 大滝ハイツ 201 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/11289 (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (22) 国際出願日: 2001 年 12 月 21 日 (21.12.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2000-405082 2000 年 12 月 22 日 (22.12.2000) JP  
特願 2001-266492 2001 年 6 月 27 日 (27.06.2001) JP
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ロコモジェン (LOCOMOGENE, INC.) [JP/JP]; 〒150-0002 東京都 渋谷区 渋谷三丁目 2 番 22 号 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: SYNOVIAL MEMBRANE CELL PROTEIN

(54) 発明の名称: 滑膜細胞タンパク質

(57) Abstract: A novel protein synoviolin and a gene encoding the same are disclosed. This protein is expressed specifically in the synovial membrane tissue and associated with an autoantibody which recognizes this protein in patients with rheumatoid arthritis (RA). This protein or its antibody is expected as being useful as an RA-specific diagnostic marker. Moreover, it is expected that an RA remedy could be screened by using the above gene or protein. A transgenic animal of the synoviolin gene is also provided. This transgenic animal is usable as an RA model animal in developing a remedy for RA.

(57) 要約:

本発明は、新規タンパク質シノビオリン (Synoviolin) と、これをコードする遺伝子を開示する。このタンパク質は滑膜組織に特異的に発現するとともに、慢性関節リウマチ (RA) 患者において本タンパク質を認識する自己抗体の存在を伴う。本発明のタンパク質またはその抗体は、RA の特異的な診断マーカーとして期待できる。また本発明の遺伝子またはタンパク質を利用して、RA の治療薬スクリーニングの可能性を与える。さらに本発明は、synoviolin 遺伝子のトランスジェニック動物を提供する。本発明のトランスジェニック動物は、RA のモデル動物として、RA 治療薬開発に利用することができる。





(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

### 滑膜細胞タンパク質

#### 技術分野

本発明は、慢性関節リウマチ（以下RAと省略する）に関連する新規なタンパク質、このタンパク質をコードするポリヌクレオチド、そしてこれらタンパク質やポリヌクレオチドの用途に関するものである。より具体的には、RAの特異的な診断マーカーとして期待できる新規なタンパク質に関する。また、RAの治療薬開発に新しいアプローチを与える新規な遺伝子にも関連している。

#### 背景技術

RAは、関節の滑膜組織に異常な増殖が見られる全身性の慢性炎症性疾患である。滑膜細胞（synovial cell）は、関節の滑膜で1－6層の上皮様層を形成する繊維芽細胞様の細胞で、滑液にプロテオグリカンやヒアルロン酸を供給するものとされている。RA患者の関節では、滑膜組織の増殖、その結果として引き起こされる多層構造、滑膜細胞の他の組織への浸潤といったような症状が観察される。またRA患者の血清中には、自己のIgGのFc領域に対する自己抗体が存在することから、自己免疫疾患のひとつとして考えられているがその病因については未だに解明されていない。

前述の自己のIgGを認識する自己抗体の存在は、RAの特徴的な診断指標として古くから利用されてきた。最近では、変性ヒトIgGを主成分とする自己抗体検出用キットが商業的に供給されている。なお、この自己抗体はRA因子とも呼ばれている。RA因子の検出に基づくRAの診断は、疾患に対する特異性、抗体が生じるシステムの解明がなされておらず病因との関連がはっきりしていない、といった問題点がある。

RAの病態を、生体内における多彩な免疫反応と骨破壊を伴った関節滑膜の増殖性

疾患という2つの側面からとらえた場合、前者の免疫反応に関しては多くの研究がなされ、その分子機序が明らかにされつつある。しかし後者の関節滑膜細胞の研究に関しては、それがRAの主座であるのにも関わらず、その細胞生物学的な特徴すら明らかにされていないのが現状である。RAのような、慢性・難治性疾患の発症や進展の背後にある分子機序を解明することは、疾患の診断、予防、そして治療に必要不可欠である。更に、高齢化の進行がとどまる気配の無い現状では、加齢性疾患でもあるRAの病態解明は社会的に見ても重要な課題である。

#### 発明の開示

本発明は、RAの診断や治療に新しいアプローチをもたらす新規なタンパク質、ならびにこのタンパク質をコードする新規な遺伝子の提供を課題としている。本発明が提供するタンパク質とそれをコードするポリヌクレオチドは、RAの病因により密接に関連し、診断においては有用な情報を与え、治療技術の開発に当たっては創薬に結びつくものである。さらに本発明は、該タンパク質をコードする遺伝子を発現するトランスジェニック動物、および該遺伝子を欠損させたノックアウト動物を提供することを課題としている。これらの動物は、本発明の遺伝子の機能を解析し、モデル動物としてRAの治療法や治療薬を開発するために有用である。

本発明者らは、RA患者の培養ヒト滑膜細胞を免疫原として得た抗ヒト滑膜細胞抗体を用い、RA患者の滑膜細胞のcDNAライブラリーをイムノスクリーニングすることにより、RA患者の滑膜組織で発現している新規な遺伝子の単離に成功した。そしてこの遺伝子がコードするタンパク質を、この遺伝子が発現している組織である滑膜細胞 (synovial cell) にちなんでシノビオリン (Synoviolin) と名づけた。

本発明者らは、前記培養滑膜細胞の分子量約 80kDa、140kDa、そして 220kDa 分画に対する抗ヒト滑膜細胞抗体の反応性が、前記シノビオリン遺伝子の発現産物により吸収されることを確認した。また、これらのバンドや、前記シノビオリン遺

伝子の発現産物が、RA患者の血中に存在する抗体との反応性を示すことを見出した。更に、抗ヒト滑膜細胞抗体は、RA患者の滑膜組織に対して強い反応性を示すことを確認した。

また本発明者らは、生化学的な結合実験により、シノビオリンの天然リガンドであるシノビオリンリガンド（以下、SLと省略する）の存在を明らかにした。SLは、シノビオリンのリガンドとして本発明者らが初めて単離したタンパク質である。しかしSLをコードするDNAの塩基配列に基づく検索を試みたところ、S1-5と呼ばれる公知の遺伝子が、5'末端領域と3'末端領域において共通の塩基配列を含むことが明らかとなった。本発明者らが単離したSLとS1-5は、DNAの部分配列のみならず遺伝子の大きさ、発現産物の分子量などがほぼ同じであり、同一のタンパク質である可能性が高い。S1-5 [“FBNL” (fibrillin-like) または “EFEMP1” (EGF-containing fibrillin-like extracellular matrix protein 1) とも呼ばれる] は、ヒト2倍体繊維芽細胞 (human diploid fibroblast) で過剰発現している遺伝子として単離された (Lecka-Czernik, B. et al., Molecular and Cellular Biology, 15, 120-128, 1995)。構造的には、DNA合成を促進するEGF様ドメイン (Epidermal Growth Factor-like domain) を持つ。S1-5については構造と核酸合成の促進活性 (細胞増殖活性) は見出されている。また、最近S1-5の変異が Malattia Leventinese (ML) および Doyme honeycomb retinal dystrophy (DHRD) と関連していることが報告 (Stone, E. M. et al., Nature Genetics 22, 199-202, 1999) されているものの、RAとの関連については知られていない。またシノビオリンとの親和性については、本発明者らによるまったく新規な知見であることは言うまでもない。

さらに本発明者らは、シノビオリン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスおよびシノビオリン遺伝子を欠損させたノックアウトマウスを作製し、その表現型を観察した。シノビオリン分子をマウスで過剰に発現させた場合、関節では滑膜の増生、骨、軟骨破壊が認められ、慢性リウマチ関節炎と酷似した症状を示した。一方、シノビオリン遺伝子を完全 (ホモ) に欠損させた場合には、胎生期のマウスで

不完全な肢芽発生と骨格形成が認められた。これらの表現型によると、滑膜組織だけでなく、軟骨・骨組織の発生・分化・再生、および代謝へのシノビオリンの関与が示唆される。また、シノビオリン強発現マウスの関節症の病変部位では、滑膜、軟骨、骨組織への代謝、再生が積極的に誘導されていた。これらの結果は、シノビオリン分子がRAを含む関節症へ関与していることを明確に示すものである。更に、シノビオリン強発現マウスが関節症モデル動物として有用であることが確認された。

本発明者らは、これらの新規な知見に基づいて、シノビオリンとその遺伝子、その抗体、あるいはリガンドの治療や診断への有用性を明らかにすることにより本発明を完成した。さらに本発明者らは、シノビオリン遺伝子を導入したトランスジェニック動物を作製し、RAの疾患モデルとしての有用性を示した。また本発明者らはシノビオリン遺伝子をlacZ遺伝子に置換したノックイン動物を作成した。シノビオリン遺伝子のノックイン動物は、シノビオリン遺伝子の欠損による影響の解析が可能となる他、シノビオリン遺伝子の内因性プロモーターにより発現されるLacZ ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性として)の検出により、シノビオリン遺伝子プロモーターの活性を容易に検出することができる。このノックイン動物を利用して、シノビオリン遺伝子の発現を調節する化合物をスクリーニングすることが可能となる。リウマチ患者の関節でのシノビオリン遺伝子の発現亢進を抑制することにより、滑膜増生を防ぎ疾患を寛解させることも可能と考えられる。

本発明者らが見出した遺伝子は、RAの疾患の主座である滑膜組織の増殖に密接に関連しており、診断においてはきわめて重要な情報を与えるものである。また、RAの病因である滑膜組織の増殖に関与する本発明の遺伝子、その発現産物、発現産物に対する自己抗体、更に発現産物のリガンドも、RAの病態を説明する上で不可欠な物質と考えられる。特にシノビオリンを認識する自己抗体がRA患者の血中に見出されることは、RAの診断上まったく新しいアプローチをもたらすものである。またこれらの物質は、RAの治療方法の開発においても、今までに無い新しいアプローチ

をもたらすものでもある。

また、シノビオリンリガンドとして同定されたS1-5の変異が、MLおよびDHRDに関連していることから、シノビオリンもまた、これらの疾患の関与している可能性がある。従って、シノビオリンはこれらの疾患の診断に利用され得る他、シノビオリンリガンドとシノビオリンとの結合を調節する化合物や、シノビオリンのリガンドとして作用する化合物等は、これらの疾患に対する医薬の候補となる。

また、シノビオリンは発生において未分化間葉系細胞で発現している。したがってシノビオリンを細胞マーカーとして未分化間葉系細胞をセルソーターなどにより分離することができる。分離された未分化間葉系細胞は、試験管内での組織再生のために利用することができる。試験管内で関節を再構築することができれば、慢性リウマチ患者のみならず、関節破壊に苦しむ多くの患者に対する再生医療に有用である。

すなわち本発明は、以下のシノビオリンタンパク質、その抗体、それをコードするポリヌクレオチド、それらの用途、シノビオリンリガンドとその用途、ならびにシノビオリン遺伝子の発現が改変されたトランスジェニック動物およびその用途に関する。

〔1〕下記（a）から（e）のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

（a）配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド、

（b）配列番号：1に記載の塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド、

（c）配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

（d）配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリン

ジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド

(e) 配列番号：1に記載の塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド

〔2〕配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。

〔3〕〔1〕、または〔2〕に記載のポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質またはペプチド。

〔4〕次の(1)－(3)からなる群から選択される少なくとも1つの活性を有する〔3〕に記載の蛋白質またはペプチド。

(1) 慢性関節リウマチ患者の血液に見出される抗体と結合する

(2) シノビオリンリガンドS1-5と結合する

(3) 滑膜増生を促進する

〔5〕〔1〕、または〔2〕に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター。

〔6〕〔1〕に記載のポリヌクレオチドまたは〔5〕に記載のベクターを保持する形質転換細胞。

〔7〕〔6〕に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、〔3〕に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。

〔8〕〔3〕に記載の蛋白質またはペプチドに結合する抗体。

〔9〕〔3〕に記載のタンパク質またはペプチドを含む、〔3〕に記載のタンパク質またはペプチドを認識する抗体を分析するための免疫学的分析用試薬。

〔10〕慢性関節リウマチの診断、または治療効果の判定を目的とするものである〔9〕の免疫学的分析用試薬。

〔11〕〔3〕に記載のタンパク質またはペプチドと反応する抗体を含む、〔3〕

に記載のタンパク質を分析するための免疫学的分析用試薬。

〔1 2〕慢性関節リウマチの診断、または治療効果の判定を目的とするものである

〔1 1〕に記載の免疫学的分析用試薬。

〔1 3〕分析すべき〔3〕に記載のタンパク質が滑膜細胞に存在するものである〔1 2〕の免疫学的分析用試薬。

〔1 4〕次の工程を含む、生体試料中の〔3〕に記載の蛋白質、および／またはその部分ペプチドに結合する抗体の測定方法。

(1)生体試料を〔3〕に記載の蛋白質、および／またはその部分ペプチドと接触させる工程、および

(2)〔3〕に記載の蛋白質、および／またはその部分ペプチドに結合する抗体を検出する工程

〔1 5〕次の工程を含む、生体試料中の〔3〕に記載の蛋白質、および／またはその部分ペプチドの測定方法。

(1)生体試料を〔8〕に記載の抗体と接触させる工程、および

(2)〔3〕に記載の蛋白質、および／またはその部分ペプチドに結合する、〔8〕に記載の抗体を検出する工程

〔1 6〕配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

〔1 7〕次の工程を含む、生体試料中の〔1〕または〔2〕に記載のポリヌクレオチドの測定方法。

(1)生体試料を〔1 6〕に記載のポリヌクレオチドと接触させる工程、および

(2)〔1〕または〔2〕に記載のポリヌクレオチドにハイブリダイズする、〔1 6〕に記載のポリヌクレオチドを検出する工程

〔1 8〕〔1 6〕に記載のポリヌクレオチドを含む、〔1〕または〔2〕に記載のポリヌクレオチドの測定用キット。

〔1 9〕〔3〕に記載のタンパク質または該タンパク質をコードする遺伝子の発現



を指標に、該タンパク質を発現する細胞を検出または分離する方法。

〔20〕細胞がリウマチ滑膜細胞である、〔19〕に記載の方法。

〔21〕細胞が未分化間葉系細胞である、〔19〕に記載の方法。

〔22〕〔8〕に記載の抗体を含む、〔3〕に記載のタンパク質を発現する細胞の検出または分離用試薬。

〔23〕次の工程を含む、慢性関節リウマチの検出方法であって、慢性関節リウマチのマーカーが、〔1〕に記載のポリヌクレオチド、〔3〕に記載のタンパク質、〔3〕に記載のペプチド、〔3〕に記載のタンパク質に結合する抗体、および〔3〕に記載のペプチドに結合する抗体からなる群から選択された少なくともひとつのマーカーである方法。

i) 被検者の生体試料中に存在する慢性関節リウマチのマーカーを検出する工程、および

ii) 工程 i) の検出結果を、慢性関節リウマチと関連付ける工程

〔24〕生体試料が被検者の血液であり、慢性関節リウマチのマーカーが〔3〕に記載のタンパク質に結合する抗体、および／または〔3〕に記載のペプチドに結合する抗体である〔23〕に記載の方法。

〔25〕生体試料が被検者の滑膜組織または滑膜細胞であり、慢性関節リウマチのマーカーが〔1〕に記載のポリヌクレオチド、および／または〔3〕に記載のタンパク質である〔23〕に記載の方法。

〔26〕次の工程を含む、被験化合物の〔3〕に記載のタンパク質またはペプチドと結合する活性の検出方法。

a) 被験化合物を〔3〕に記載のタンパク質またはペプチドと接触させる工程、および

b) 被験化合物と前記タンパク質またはペプチドとの結合を観察する工程

〔27〕次の工程を含む、〔3〕に記載のタンパク質またはペプチドと結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

a) [26]に記載の方法によって被験化合物の[3]に記載の蛋白質またはペプチドに対する結合活性を検出する工程、および

b) 対照と比較して前記結合活性が高い被験化合物を選択する工程

[28] 次の工程を含む、[3]に記載のタンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性の検出方法。

a) 被験化合物存在下で[3]に記載のタンパク質またはペプチドとそのリガンドとを接触させる工程、および

b) 前記タンパク質またはペプチドに結合するリガンド、および/または被験化合物を検出する工程

[29] リガンドがシノビオリンリガンドS1-5である[28]に記載の方法。

[30] 次の工程を含む、[3]に記載のタンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法。

a) [28]に記載の方法によって、被験化合物の[3]に記載のタンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を検出する工程、および

b) 対照と比較して前記阻害活性が高い被験化合物を選択する工程

[31] 次の工程を含む、被験化合物の[3]に記載のタンパク質によるシグナル伝達を調節する活性を検出する方法。

a) 前記タンパク質のリガンドの存在下または不存在下で、被験化合物と前記タンパク質を接触させる工程、および

b) 前記タンパク質を介するシグナル伝達を検出する工程

[32] 次の工程を含む、[3]に記載のタンパク質によるシグナル伝達を調節する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

a) [31]に記載の方法によって、被験化合物の前記タンパク質によるシグナル伝達を調節する活性を検出する工程、および

b) 対照と比較して前記調節の活性が高い被験化合物を選択する工程

[33] 次の工程を含む、[1]に記載のポリヌクレオチドの発現を調節する活性

の検出方法であって、

a) 被験化合物の存在下で〔1〕に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞を培養する工程、および

b) 前記ポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

〔34〕次の工程を含む、〔1〕に記載のポリヌクレオチドの発現を調節する化合物のスクリーニング方法。

a) 〔33〕に記載の方法によって、被験化合物の〔1〕に記載のポリヌクレオチドの発現を調節する活性を検出する工程、および

b) 対照と比較して前記活性に差を有する被験化合物を選択する工程

〔35〕〔27〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含む、シノビオリン刺激剤。

〔36〕〔30〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含む、シノビオリンとシノビオリンリガンドとの結合阻害剤。

〔37〕〔30〕または〔32〕のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含む、滑膜増生阻害剤。

〔38〕〔1〕若しくは〔2〕に記載のポリヌクレオチド、〔3〕に記載の蛋白質若しくはペプチド、および〔5〕に記載のベクターからなる群から選択されるいずれかの成分を有効成分として含有する医薬組成物。

〔39〕〔1〕または〔2〕に記載のポリヌクレオチドの発現が改変されているか、または該改変を誘導することができるトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔40〕〔1〕または〔2〕に記載のポリヌクレオチドが外来的に導入されている、〔39〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔41〕慢性関節リウマチモデル動物である、〔40〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔42〕内因性に持つ〔1〕または〔2〕のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現が抑制されているトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔４３〕他の遺伝子がノックインされている、〔４２〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔４４〕〔４０〕または〔４２〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物に由来する細胞。

〔４５〕次の工程を含む、〔１〕または〔２〕に記載のポリヌクレオチドの内因性プロモーターの活性を調節する活性の検出方法。

a) 〔１〕または〔２〕に記載のポリヌクレオチドの内因性プロモーターの制御下にレポーター遺伝子を発現することができる発現系に、被験化合物を接触させる工程、および

b) レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程

〔４６〕前記発現系が、〔４３〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物またはこの動物に由来する細胞である〔４５〕に記載の方法。

〔４７〕次の工程を含む、〔１〕または〔２〕に記載のポリヌクレオチドの内因性プロモーターの活性を調節する化合物のスクリーニング方法。

a) 〔４５〕に記載の方法によって、被験化合物の〔１〕または〔２〕に記載のポリヌクレオチドの内因性プロモーターの活性を調節する活性を測定する工程、および

b) 対照と比較して、前記活性に差がある被験化合物を選択する工程

〔４８〕〔３４〕、または〔４７〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含む、〔１〕に記載のポリヌクレオチドの発現を調節するための医薬組成物。

また本発明は、〔２７〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を投与する工程を含む、シノビオリンの刺激方法に関する。あるいは本発明は、〔３０〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を投与する工程を含む、シノビオリンとシノビオリンリガンドとの結合阻害方法に関する。更に本発明は、〔３０〕または〔３２〕のスクリーニング方法によって得ることが

できる化合物を投与する工程を含む、滑膜増生阻害方法に関する。加えて本発明は、〔1〕若しくは〔2〕に記載のポリヌクレオチド、〔3〕に記載の蛋白質若しくはペプチド、および〔5〕に記載のベクターからなる群から選択されるいずれかの成分を投与する工程を含む、滑膜増生促進方法に関する。更に本発明は、〔34〕、または〔47〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を投与する工程を含む、〔1〕に記載のポリヌクレオチドの発現を調節するための方法に関する。

また本発明は、〔27〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物の、シノビオリンの刺激剤の製造における使用に関する。あるいは本発明は、〔30〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物の、シノビオリンとシノビオリンリガンドとの結合阻害剤の製造における使用に関する。更に本発明は、〔30〕または〔32〕のスクリーニング方法によって得ることができる化合物の、滑膜増生阻害剤の製造における使用に関する。加えて本発明は、〔1〕若しくは〔2〕に記載のポリヌクレオチド、〔3〕に記載の蛋白質若しくはペプチド、および〔5〕に記載のベクターからなる群から選択されるいずれかの成分の、滑膜増生促進剤の製造における使用に関する。更に本発明は、〔34〕、または〔47〕に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物の、〔1〕に記載のポリヌクレオチドの発現を調節するための医薬品製剤の製造における使用に関する。

本発明は、配列番号：1に示す塩基配列の蛋白質コード領域を含むシノビオリンをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明においてポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAであってよい。また、修飾されたヌクレオチドを含むものであってもよい。本発明によるシノビオリンをコードするポリヌクレオチドは、前記RA患者の滑膜細胞から公知の方法によりクローニングすることができる (Nucleic Acid Res. 16:7583-7600, 1988)。具体的には、滑膜組織や培養細胞として回収したRA患者の関節炎を発症した組織に由来する滑膜細胞から抽出したmRNAをもとにcDNAラ

イブラリーを得る (Nucleic Acid Research, 16, 7583, 1988)。配列番号：1に示した塩基配列に基づいて設定したプローブを用いて、このライブラリーからハイブリダイズするクローンをスクリーニングすることによってシノビオリン遺伝子を単離することができる。

本発明はまた、先に述べたシノビオリンと機能的に同等なタンパク質をコードするポリヌクレオチドをも含む。本発明においてシノビオリンと機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチドを、シノビオリンと機能的に同等なポリヌクレオチドと言う。機能的に同等なタンパク質とは、第1にシノビオリンと免疫学的に同等なタンパク質を示すことができる。すなわち本発明におけるシノビオリンと機能的に同等なタンパク質とは、シノビオリンを特異的に認識し、RA患者の血清中に存在する抗体と反応するものであれば、シノビオリンのドメインであることができる。あるいはこの免疫学的に活性なドメインを含むタンパク質の断片であることもできる。これらの変異体は、RA患者血清パネルと正常者の血清を使ってシノビオリンの断片をスクリーニングすることによって当業者であれば容易に選択することができる。

本発明によるシノビオリンと機能的に同等なタンパク質は、免疫学的な特性のみならずSL (S1-5) との結合特性に基づいても定義される。すなわち本発明は、SL (S1-5) との親和性を備えるシノビオリンの断片を含む。これらの変異体は、SL (S1-5) を使って候補タンパク質をスクリーニングすることによって当業者であれば容易に選択することができる。たとえば本発明者らが見出した SL (S1-5) は、実施例に示したようにシノビオリンのcDNAにおいて1233-1592番目に相当する120アミノ酸残基をシノビオリンとの結合に必要な領域として要求する。したがって、この領域を構成するアミノ酸配列からなるタンパク質、あるいはこのアミノ酸配列を含むタンパク質は本発明によるシノビオリンと機能的に同等なタンパク質を構成する。SLとしては accession number AAA65590 (nucleotide accession U03877)、I38449、NP\_061489 (nucleotide accession NM\_018894)、NP\_004096 (nucleotide

accession NM\_004105)、または Q12805 に特定される S1-5タンパク質や、それらに類似したタンパク質であってヒトシノビオリンタンパク質(配列番号: 2)に結合する活性を有するタンパク質を用いることができる(Lecka-Czernik, B. et al., Mol. Cell. Biol. 15, 120-128, 1995; Heon, E. et al., Arch. Ophthalmol. 114, 193-198, 1996; Ikegawa, S. et al., Genomics 35, 590-592, 1996; Katsanis, N. et al., Hum. Genet. 106, 66-72, 2000; Giltay, R. et al., Matrix Biol. 18, 469-480, 1999; Stone, E. M. et al., Nat. Genet. 22, 199-202, 1999)。

また、ヒトシノビオリンと機能的に同等なタンパク質としては、滑膜増生を促進する活性を有するタンパク質が挙げられる。ヒトシノビオリン遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスは、有意な頻度で関節炎を伴う指の膨脹が認められた。組織学的には、これらの指関節では滑膜増生を伴う骨破壊と異常な骨新生が認められた。ヒトシノビオリンタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、滑膜増生を促進する活性に基づいても定義される。滑膜増生の促進は、トランスジェニック動物の作製により検証することができる他、関節への局所的な遺伝子導入、あるいはインビトロ培養滑膜細胞においてタンパク質を発現させることにより検証することができる。本発明のポリヌクレオチドを用いてトランスジェニック動物を得る方法は、後に述べる。

また、ヒトシノビオリンと機能的に同等なタンパク質としては、正常な骨形成または四肢の発達に貢献する活性を有するタンパク質が挙げられる。シノビオリンは発生において頭頂骨、四肢、耳などの骨および軟骨が形成される部位に強く発現しており、四肢形成期においては Apical Ectodermal Ridge (AER; 外胚葉頂堤) および軟骨・骨原基に強い発現が観察された。ターゲティングにより内因性シノビオリン遺伝子を欠損させたノックアウトマウス胚は、頭頂部から臀部までの長さが短く、頭蓋や四肢の形成が未熟である傾向が認められ、ホモ接合体では肢芽、上下顎骨および耳に形態異常を示し高い確率で胎生致死となった。シノビオリン遺伝子ホモノ

ックアウトマウスは、胎生期において肢芽の発生異常が認められ、また、軟骨及び骨への形成が認められず、肢芽と軟骨、骨の発生部位にシノビオリンの発現が認められたことから、シノビオリン分子が骨格形成および四肢の発達に関与していることが示される。

explant法による培養系を用いた解析では、シノビオリンノックアウト (lacZ遺伝子のノックイン) マウス胎仔の肢芽由来の細胞におけるLacZの発現は軟骨・骨および肢の原基となると考えられる未分化間葉系細胞にのみ認められた。さらにアルカリフォスファターゼ染色、Kossaの染色などにより、骨・軟骨形成能がホモノックアウト由来の細胞では遅延していることが確認された。正常な骨形成または四肢の発達への関与は、ノックアウト動物の作製により検証することができる他、インビトロ培養における骨・軟骨細胞のマーカー遺伝子の発現の解析や骨形成能の解析などを利用して行うことも考えられる。またある蛋白質が正常な骨形成または四肢の発達に貢献する活性を有することは、本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制されたノックアウト動物や培養細胞において、当該ポリヌクレオチドがコードする蛋白質の投与、あるいは当該蛋白質をコードするDNAまたはRNAの発現によって失われた機能が相補されることによっても確認することができる。

加えて本発明によるシノビオリンと機能的に同等なタンパク質は、シノビオリンが有する生化学的な活性に基づいても定義される。シノビオリンの生化学的な活性とは、たとえばチロシンキナーゼやユビキチンリガーゼ活性を示すことができる。これらの生化学的な活性は、シノビオリンに見出された各種のモチーフや、実施例の結果に裏付けられている。すなわち本発明は、シノビオリンが有する少なくとも一つの生化学的な活性を維持したシノビオリンの断片を含む。シノビオリンの生化学的な活性の確認方法や、それぞれの生化学的な活性を保持している領域については後に具体的に述べる。

これらのシノビオリンに機能的に同等なタンパク質は、他のタンパク質との融合タンパク質とすることができる。たとえば、FLAGタグ、HAタグ、あるいはヒスチジ



ンタグなどの付加的なアミノ酸配列が付加され、前記シノビオリンに機能的に同等なタンパク質としての少なくとも一つの性状を維持したタンパク質は、前記機能的に同等なタンパク質に含まれる。付加するタンパク質が、シノビオリンとは異なる活性を有している場合も、シノビオリンが有する少なくとも一つの機能を維持している場合には、その融合タンパク質は、本発明に置ける機能的に同等なタンパク質に含まれる。

前記本発明のポリヌクレオチドに対して変異を含む塩基配列で構成されるポリヌクレオチドも、当業者によって公知の方法（実験医学別冊・遺伝子工学ハンドブック、pp246-251、羊土社、1991年発行）で単離することができる。たとえば類似する遺伝子を含むライブラリーを対象に、配列番号：1に示す塩基配列（またはその断片）をプローブとしてスクリーニングすれば、相同性の高い塩基配列を持ったDNAをクローニングすることが可能である。このようなライブラリーとしては、配列番号：1の塩基配列に対してランダムに変異を入れたもの、ヒト以外の種に由来する滑膜組織のcDNAライブラリー等を示すことができる。

与えられた塩基配列に対してランダムに変異を加える方法としては、たとえばDNAの亜硝酸処理による塩基対の置換が知られている（Proc. Natl. Acad. Sci. US A., 79:7258-7260, 1982）。この方法では、変異を導入したいセグメントを亜硝酸処理することにより、特定のセグメント内にランダムに塩基対の置換を導入することができる。あるいはまた、目的とする変異を任意の場所にもたらす技術としてはgapped duplex法等がある（Methods in Enzymol., 154:350-367, 1987）。変異を導入すべき遺伝子をクローニングした環状2本鎖のベクターを1本鎖とし、目的とする部位に変異を持つ合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせる。制限酵素により切断して線状化させたベクター由来の相補1本鎖DNAを、前記環状1本鎖ベクターにアニールさせ、前記合成ヌクレオチドとの間のギャップをDNAポリメラーゼで充填し、更にライゲーションすることにより完全な2本鎖環状ベクターとする。

改変されるアミノ酸の数は、典型的には50アミノ酸以内であり、好ましくは30

アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内（例えば、1アミノ酸）であると考えられる。

アミノ酸を人為的に置換する場合、性質の似たアミノ酸に置換すれば、もとのタンパク質の活性が維持されやすいと考えられる。本発明のタンパク質には、上記アミノ酸置換において保存的置換が加えられたタンパク質であって、ヒトシノビオリン蛋白質（配列番号：2）と機能的に同等なタンパク質が含まれる。保存的置換は、タンパク質の活性に重要なドメインのアミノ酸を置換する場合などにおいて重要であると考えられる。このようなアミノ酸の保存的置換は、当業者にはよく知られている。

保存的置換に相当するアミノ酸のグループとしては、例えば、塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 $\beta$ 分岐アミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族アミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などが挙げられる。

また、非保存的置換によりタンパク質の活性などをより上昇（例えば恒常的活性化型タンパク質などを含む）または下降（例えばドミナントネガティブなどを含む）させることも考えられる。

配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、天然に存在する蛋白質を含む。一般に真核生物の遺伝子は、インターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を有する。この多型現象によって生じた塩基配列の変化によって、1または複数個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および／また

は付加される場合がある。このように自然に存在する蛋白質であって、かつ配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、本発明に含まれる。

実際に本発明者らは、本発明の遺伝子を複数の個体からクローニングし、その塩基配列を決定することによって、1アミノ酸を欠失したクローンを確認した。このようなアミノ酸配列に変異を含む蛋白質、並びにそれをコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、本発明に含まれる。本発明者らが確認した1アミノ酸を欠失したクローンの塩基配列を配列番号：6に、そしてこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号：7に示した。配列番号：6の塩基配列は、配列番号：1における1293-1295に相当するgcaを欠損している。その結果、配列番号：7に記載のアミノ酸配列は、配列番号：2における412位のAlaを欠損している。

あるいは多型現象によって塩基配列に変化はあっても、アミノ酸配列が変わらない場合もある。このような塩基配列の変異は、サイレント変異と呼ばれる。サイレント変異を有する塩基配列からなる遺伝子も、本発明に含まれる。なおここで言う多型現象とは、集団内において、ある遺伝子が個体間で異なる塩基配列を有することを言う。多型現象は、異なる遺伝子が見出される割合とは無関係である。

この他、シノビオリンと機能的に同等なタンパク質を得る方法として、ハイブリダイゼーションを利用する方法を挙げることができる。すなわち、配列番号：1に示すような本発明によるシノビオリンをコードするポリヌクレオチド、あるいはその断片をプローブとし、これとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを単離するのである。ハイブリダイゼーションをストリンジェントな条件下で実施すれば、塩基配列としては相同性の高いポリヌクレオチドが選択され、その結果として単離されるタンパク質にはシノビオリンと機能的に同等なタンパク質が含まれる可能性が高まる。相同性の高い塩基配列とは、たとえば70%以上、望ましくは90%以上の同一性を示すことができる。

なおストリンジェントな条件とは、具体的には例えば 6×SSC、40%ホルムアミド、25℃でのハイブリダイゼーションと、1×SSC、55℃での洗浄といった条件を示すことができる。ストリンジェンシーは、塩濃度、ホルムアミドの濃度、あるいは温度といった条件に左右されるが、当業者であればこれらの条件を必要なストリンジェンシーを得られるように設定することは自明である。

ハイブリダイゼーションを利用することによって、たとえばヒト以外の動物種におけるシノビオリンのホモログをコードするポリヌクレオチドの単離が可能である。ヒト以外の動物種、すなわちマウス、ラット、ウサギ、ブタ、あるいはヤギ等の動物種から得ることができるポリヌクレオチドがコードするシノビオリンのホモログは、本発明における機能的に同等なタンパク質を構成する。

本発明によるポリヌクレオチドは、その由来を問わない。すなわち、cDNA、ゲノムDNAのほか、合成によって得ることもできる。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。

ヒトシノビオリン（配列番号：2）に変異を導入して得たタンパク質や、上記のようなハイブリダイゼーション技術等を利用して単離されるポリヌクレオチドがコードするタンパク質は、通常、ヒトシノビオリン（配列番号：2）とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも30%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上（例えば、95%以上）の配列の同一性を指す。塩基配列やアミノ酸配列の同一性は、インターネットを利用したホモロジー検索サイトを利用して行うことができる【例えば日本DNAデータバンク（DDBJ）において、FASTA、BLAST、PSI-BLAST、および SSEARCH 等の相同性検索が利用できる【例えば日本DNAデータバンク（DDBJ）のウェブサイトの相同性検索（Search and Analysis）のページ；<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>】。また、National Center for Biotechnology Information（NCBI）において、BLASTを用いた検索を行うことができる（例えばNCBIのホームページのウェブサイトのBLASTの

ページ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol., 1990, 215(3):403-10; Altschul, S. F. & Gish, W., Meth. Enzymol., 1996, 266:460-480; Altschul, S. F. et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402) ] 。

例えば Advanced BLAST 2.1におけるアミノ酸配列の同一性の算出は、プログラムにblastpを用い、Expect値を10、Filterは全てOFFにして、MatrixにBLOSUM62を用い、Gap existence cost、Per residue gap cost、および Lambda ratioをそれぞれ 11、1、0.85（デフォルト値）に設定して検索を行い、同一性（identity）の値（%）を得ることができる（Karlin, S. and S. F. Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68; Karlin, S. and S. F. Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7）。

本発明は、これらのポリヌクレオチドのタンパク質生産以外の用途も提供するものである。すなわち本発明は、本発明によって提供されるシノビオリンをコードするポリヌクレオチド、あるいはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチドを含む。アンチセンスは、遺伝子の転写を有効に阻害するために、15-20ヌクレオチド程度の鎖長とすることが好ましい。シノビオリンが滑膜細胞の異常な増殖を支えているとすれば、RAの治療においてシノビオリンのアンチセンスが果たす役割は大きい。遺伝子発現の制御という観点から見ると、アンチセンスのみならずリボザイムの設計も可能である。すなわち、配列番号：1で示すDNAのコード領域から転写されたRNAを認識し、これを切断するリボザイムを設計することができる。

本発明はまた、これら本発明のポリヌクレオチドまたはその相補鎖と相補的な少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチドに関する。これらのポリヌクレオチドは、好ましくは上記の本発明のポリヌクレオチドまたはその相補鎖と相補的な20ヌクレオチド以上、より好ましくは25ヌクレオチド以上、さらに好ましくは30ヌクレオチド以上の鎖長を持つポリヌクレオチドである。ここで「相補鎖」とは、A:T（ただしRNAの場合は U）、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に

対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有する塩基配列を含む。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用することができる。これらには、例えば上記の本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチドが含まれる。

ハイブリダイゼーションは、本発明のポリヌクレオチドに対して特異的であることが好ましい。特異的とは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下で、他のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。

これらのポリヌクレオチドは、シノビオリン遺伝子の検出や増幅を可能とするプローブやプライマーとして有用である。本発明によるプローブやプライマーは、与えられたストリンジェンシーの基で特異的なハイブリダイズが可能となるように少なくとも15mer程度の鎖長を備え、配列番号：1に示した塩基配列の中でも、シノビオリンに特異的な配列に対してハイブリダイズできる塩基配列を持つものが好ましい。与えられた塩基配列に基づいて、プローブやプライマーに有用な塩基配列を設定することは当業者にとって自明である。本発明に基づいて提供されるシノビオリン遺伝子特異プローブやプライマーを利用すれば、滑膜細胞標本のインサイチュにおけるハイブリダイゼーションやPCRが可能となる。シノビオリンはRA患者の滑膜組織に強発現していることから、その細胞内における発現状態の把握は、RA関節炎症状を把握するための重要な情報を与えるものと考えられる。

本発明による新規なタンパク質であるシノビオリンは、RA患者滑膜組織から得ることができる。滑膜細胞はインビトロで培養することができるので、この培養物からシノビオリンを回収することが可能である。具体的には、RA患者から滑膜切除術(synovectomy)により外科的に切除された滑膜組織等をもとにこの組織から滑膜

細胞を分離する。分離した細胞を培養すれば、滑膜細胞を付着性細胞として回収することができる (J. Clin. Invest. 92:186-193, 1993)。回収した細胞からは、公知のタンパク質精製技術を組み合わせてシノビオリンを抽出・精製する。

本発明は、滑膜細胞から抽出されるヒト・シノビオリンのみならず、シノビオリンと機能的に同等なタンパク質をも含むものである。すなわち、本発明のタンパク質としては、人工的か自然に生じたものかを問わず、ヒト・シノビオリンのアミノ酸配列 (配列番号：2) において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入などにより変異したタンパク質であって、ヒトシノビオリンと機能的に同等なタンパク質が含まれる。これらタンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、シノビオリンの機能が保持される限り制限はない。

シノビオリンの断片は、プロテアーゼを使った消化により得ることができる。また、配列番号：1に示したシノビオリンをコードするDNAをランダムに切断し、それをファージベクターに挿入してドメインペプチドを提示したファージライブラリーを作成することによっても得ることができる。これらのライブラリーを、シノビオリンを認識する抗体でイムノスクリーニングすれば、免疫学的に活性なドメインを決定することができる。免疫学的に活性なドメインを特定するための手法は、そのままりガンドとの結合活性を持つドメインを特定するための手法としても利用することができる。クローニングしたファージについて、挿入断片の塩基配列を決定すれば、活性ドメインのアミノ酸配列も明らかにすることができる。

本発明によるタンパク質、またはその機能的に同等なタンパク質は、糖鎖等の生理的な修飾、蛍光や放射性物質のような標識、あるいは他のタンパク質との融合といった各種の修飾を加えたタンパク質であることができる。ことに後に述べる遺伝子組み換え体においては、発現させる宿主によって糖鎖による修飾に差異が生じる可能性がある。しかしたとえ糖鎖の修飾に違いを持っていても、本明細書中に開示されたシノビオリンタンパク質と同様の性状を示すものであれば、いずれも本発明によるシノビオリン、または機能的に同等なタンパク質である。

シノビオリンは、生体材料のみならず、これをコードする遺伝子を適当な発現系に組み込んで遺伝子組み換え体 (recombinant) として得ることもできる。シノビオリンを遺伝子工学的な手法によって得るためには、先に述べたシノビオリンをコードするポリヌクレオチドを適当な発現系に組み込んで発現させれば良い。本発明に応用可能な宿主／ベクター系としては、発現ベクター pGEX-5X-3 と大腸菌を示すことができる。pGEX-5X-3 は外来遺伝子をグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させることができる (Gene, 67:31-40, 1988) ので、シノビオリンをコードする遺伝子を組み込んだ pGEX-5X-3 をヒートショックで BL21 のような大腸菌株に導入し、適当な培養時間の後に isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) を添加して GST 融合シノビオリンの発現を誘導する。シノビオリンをコードする遺伝子は、滑膜細胞の cDNA ライブラリー等を鋳型として PCR 等で増幅することにより得ることができる。本発明による GST はグルタチオンセファローース 4B に吸着するため、発現生成物はアフィニティクロマトグラフィーによって容易に分離・精製することが可能である。

シノビオリンの recombinant を得るための宿主／ベクター系としては、この他にも次のようなものを応用することができる。まず細菌を宿主に利用する場合には、ヒスチジンタグ、HA タグ、Flag タグ等を利用した融合タンパクの発現用ベクターが市販されている。酵母では、*Pichia* 属酵母が糖鎖を備えたタンパク質の発現に有効なことが公知である。糖鎖の付加という点では、昆虫細胞を宿主とするバキュロウイルスベクターを利用した発現系も有用である (Bio/Technology, 6:47-55, 1988)。更に、哺乳動物の細胞を利用して、CMV、RSV、あるいは SV40 等のプロモーターを利用したベクターのトランスフェクションが行われており、これらの宿主／ベクター系は、いずれもシノビオリンの発現系として利用することができる。また、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等のウイルスベクターを利用して遺伝子を導入することもできる。

本発明によって提供される新規なタンパク質シノビオリン、またはその免疫学的



に同等なタンパク質は、その免疫学的な特性を利用してRAの診断において有用である。RA患者の血中にはシノビオリンを認識する抗体が高い頻度で検出され、正常者の血中には実質的に検出されない。したがって、本発明によるシノビオリンを抗原として被検者が有する抗体を免疫学的に分析すれば、RAの診断において有用な情報を与える。すなわち、被検者の体液中にシノビオリンに反応する抗体が検出されたときには、被検者がRAであると診断することができる。

抗体の免疫学的分析方法には多くの方法が一般に普及している。抗原感作プレートをサンプル中の抗体と反応させ、プレート表面に捕捉される検出対象となる抗体を、抗体特異的な標識抗体で検出する方法は、抗体の免疫学的分析方法としてはもっともポピュラーな方法である (Immunochemistry, 8:871-879, 1971)。標識に酵素を用いた方法はELISA法と呼ばれ、広く普及している。また抗原を吸着させたラテックス粒子をサンプルと混合し、免疫学的な凝集反応として抗体を検出する方法も公知である (Am. J. Med., 21:888-892, 1956)。免疫学的粒子凝集反応は1試薬で迅速な分析が可能な方法であり、大規模なスクリーニングには好適な方法である。

更に、最近ではイムノクロマトグラフ法が簡易分析方法として一般化している。この方法を抗体の免疫学的分析方法に応用するには、標識シノビオリンと抗シノビオリン抗体との反応をサンプル中の抗体が阻害するような反応系を構成する。具体的には、たとえば標識シノビオリンとサンプルを最初に接触させ、クロマトグラフ的な展開によって試薬成分である抗シノビオリン抗体と接触するように配置する。サンプル中にシノビオリン抗体が存在する場合には、既に標識シノビオリンが反応してしまっているので、試薬成分である抗シノビオリン抗体とはもはや反応することができない。抗シノビオリン抗体を固定しておいて、その領域における標識シノビオリンの反応状態を観察すれば、サンプルの滴下のみでイムノアッセイを行うことができる。

多くのイムノアッセイにおいて、抗体をクラス別に分析することが可能である。

特定のクラスの抗体に関する情報が必要な場合には、IgGやIgMといったイムノグロブリンのクラスを識別しうる抗体を組み合わせれば良い。感染症では、通常、感染初期のIgM抗体測定値の上昇、その後続くIgM抗体測定値の低下とIgG抗体測定値の上昇という遷移が観察される。このようなクラス別の抗体測定値が、本発明においてもRAの臨床的な症状と関連性を持つ可能性がある。より具体的には、抗体のクラス別測定により、薬効の判定や、RA発症の予知に結びつく可能性がある。

抗体の検出においては、抗原分子そのもののみならず、化学的に合成したオリゴペプチドを抗原として用いる方法が採用されることも多い。これは、特に優勢なエピトープ、あるいは臨床的になんらかの意味を持つエピトープに特異的な分析系としたほうが非特異的な反応の影響を受けにくくなるためである。シノビオリンについても、このようなアプローチは有効である。具体的には、先に述べた免疫学的に活性なドメインペプチドを得る方法に基づいて、エピトープとして機能するドメインを決定することができる。エピトープは少なくとも3アミノ酸残基で構成できる場合のある事が知られている。また他のタンパク質との免疫学的な識別は、少なくとも8アミノ酸残基で可能となるといわれている。したがって、シノビオリンのアミノ酸配列から選択された少なくとも連続した8アミノ酸残基、通常9アミノ酸残基、好ましくは10アミノ酸残基、より好ましくは11アミノ酸残基からなり、患者血清中の抗体と反応する断片は、本発明における抗体検出用の抗原として望ましい。更に、エピトープを構成するオリゴペプチドに対して、様々な修飾を加えて免疫学的な反応性を向上させる方法も当業者には公知である。たとえば、ヒト血清アルブミンのような不活性タンパク質、あるいは無意味なアミノ酸配列の付加といった修飾が免疫学的な反応性の向上に寄与する。

本発明に基づくRAの検出方法に有用なシノビオリン、またはその機能的に同等なタンパク質、あるいはそれらの部分ペプチドは、これらの分子を認識する抗体を分析するための免疫学的分析用試薬とすることができる。本発明による免疫学的分析用試薬は、RAの診断や治療効果の判定に有用である。

本発明によるシノビオリンは、RAの治療や予防を目的としたワクチンの開発をも可能とする。シノビオリンがそのリガンドとの結合によって滑膜細胞の増殖をもたらしていると考えられるため、シノビオリンとリガンドとの結合をブロックする抗体を与えるワクチンが提供されれば、RAの治療や予防が実現する。シノビオリンのワクチンを得るには、シノビオリンのエピトープとなるドメインペプチドを中心に、もともとヒトのタンパクであるシノビオリンのドメインペプチドによる免疫刺激をもたらすアジュバントやキャリアタンパク質との組み合わせにより製剤化する方法が一般的である。

更に本発明は、シノビオリンを認識する抗体を提供する。本発明によるシノビオリン、または免疫学的に同等のタンパク質、あるいはその断片を免疫原として、公知の方法によりシノビオリンの抗体を得ることができる。通常の免疫操作によってポリクローナル抗体を得ることもできるし (Harlow, E. & Lane, D.; *Antibodies: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, 1988)、抗体産生細胞をクローニングすることによりモノクローナル抗体を得ることもできる (Kohler, G. & Milstein, C., *Nature* 256: 495-7, 1975)。モノクローナル抗体はイムノアッセイにおいて高い感度と特異性を達成するための重要なツールである。

免疫には、本発明に基づくシノビオリン（もしくはそれと免疫学的に同等なタンパク質、またはそれらの断片）を適当なアジュバントとともに免疫動物に免疫する。免疫原として有用なシノビオリンの断片として、以下のアミノ酸配列を含むペプチドを示すことができる。

Syno-P3 (SLALTGAVVAHAYYC/配列番号：3)、

Syno-P2 (TCRMDVLRASLPAQS/配列番号：4)、および

Syno-P1 (GAATTTAAGTSATAC/配列番号：5)

これらのペプチドを担体蛋白質と結合させて調製された免疫原は、シノビオリンに対して特異的で、かつ十分な結合親和性を有する抗体を与える。免疫原を得るための担体蛋白質には、スカシガイヘモシアニン(KLH)、あるいはウシ血清アルブミ

ン(BSA)等を用いることができる。免疫動物には、ウサギ、マウス、ラット、ヤギ、あるいはヒツジなどが一般に利用される。アジュバントとしては、フロイントのコンプリートアジュバント (FCA) 等が一般に用いられる (Adv. Tubercul. Res., 1: 130-148, 1956)。適当な間隔で免疫を追加し、抗体価の上昇を確認したところで採血し抗血清を得ることができる。更にその抗体画分を精製すれば、精製抗体とすることもできる。

あるいはまた、抗体産生細胞を採取して細胞融合法などによりクローニングすれば、モノクローナル抗体を得ることもできる。このときの抗体産生細胞とは、免疫動物に由来するものの他、シノビオリンに対する自己抗体を産生するRA患者から採取した抗体産生細胞を利用することもできる。更に、こうして得られた免疫動物に由来するモノクローナル抗体産生細胞の抗体遺伝子をもとに、キメラ抗体やヒト化抗体の構築が可能である。抗体をヒトに投与する場合、動物の抗体は異物として排除されるため望ましくない。そこで抗原性の強い抗体の定常領域をヒトの抗体で置換したキメラ抗体や、あるいは定常領域のみならず可変領域のフレームワークまでヒトの遺伝子で置換したヒト化抗体が必要になる。その点、RA患者の抗体産生細胞に由来する抗体の可変領域を利用すれば、ヒト型の抗体を再構成できるので、より容易に安全性の高い抗体の構築が可能である。

本発明に基づいて提供されるシノビオリンを認識するキメラ抗体、あるいはヒト化抗体は、RA患者の滑膜細胞を標的とした薬物移送システム (Drug Delivery System; DDS) に有用である。本発明によるシノビオリンを認識する抗体を使ったDDSにおいて、抗体とリンクさせることにより有用性が期待できる物質としては、Fas リガンドや、抗SL抗体などを示すことができる。

あるいは本発明の抗体は、シノビオリンの検出に有用である。シノビオリンはRA患者の滑膜組織において強発現している。したがって、滑膜細胞、滑膜組織、あるいは体液中におけるシノビオリンの検出は、RAの診断において有用な情報を与える。具体的には、滑膜組織や血液中にシノビオリンが検出されるときには、RAが進

行していると考えられる。本発明の抗体は、シノビオリンの免疫学的検出用試薬とすることができる。組織や血中に存在するタンパク質を、抗体を用いて免疫学的に検出する方法は公知である。本発明の抗体を含む免疫学的分析用試薬は、RAの診断や治療効果の判定に有用である。

また本発明の抗体は、シノビオリンを発現する細胞の分離あるいは検出に利用することができる。本発明のシノビオリンタンパク質は、発生においてはAERで発現が見られる他、滑膜、骨・軟骨および肢の原基となる未分化間葉系細胞において強く発現していた。従ってシノビオリンは、AERおよび未分化間葉系細胞のマーカーとして使用されうる。すなわちシノビオリンの発現を指標に、AERおよび未分化間葉系細胞を検出したり分離したりすることができる。抗体は適宜蛍光等により標識される。例えば、シノビオリンに対する抗体を用い、セルソーティング等によりシノビオリンを発現する細胞を分離することができる。分離された未分化間葉系細胞は、試験管内における骨・軟骨の形成、あるいは関節の再構築に有用である。

未分化間葉系細胞からは、試験管内 (in vitro) または生体内 (in vivo) において、骨、軟骨、筋、腱、脂肪、および骨髄等の間質 (stroma) が形成される (S. A. Kuznetsov et al., J. Bone Miner. Res. 12, 1335-47, 1997; D. J. Prockop Science 276, 71-4, 1997; C. M. Thompson and R. A. Young, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4587-90, 1995; A. I. Caplan, J. Orthop. Res. 9, 641-50, 1991; A. J. Friedenstein, Int. Rev. Cytol. 47, 327-59, 1976; M. Owen and A. J. Friedenstein, in "Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues", D. Evered and S. Harnett, Eds., Wiley, Chichester, UK, 1988, pp. 42-60; A. J. Friedenstein et al., Cell Tissue Kinet. 20, 263-72, 1987; B. A. Ashton et al., Clin. Orthop. Relat. Res. 151, 294-307, 1980; I. Bab e t al., Clin. Orthop. Relat. Res. 187, 243-54, 1984; S. E. Haynesworth et al., Bone 13, 81-8, 1992; A. I. Caplan, Clin. Plast. Surg. 21, 429-35, 1994; 例えばGenzyme社のウェブサイトも参照, <http://www.genzymebiosurgery.com>

/)。

例えば、未分化間葉系細胞を試験管内において分化させ、脂肪細胞系列 (adipocytic lineage)、軟骨細胞 (chondrocytic lineage)、および骨細胞系列 (osteocytic lineage) の細胞を形成させることができる (M. F. Pittenger et al., Science 284, 143-7, 1999)。

脂肪細胞への分化は、例えば、1-メチル-3-イソブチルキサンチン、デキサメタゾン、インシュリン、およびインドメタシン処理により誘導することができる (M. F. Pittenger, 米国特許第5827740号, 1998)。軟骨細胞への分化は、例えば、遠心等により細胞を微小塊にした後、血清を含まない培地中で transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 3 で刺激することにより分化させることができる (A. M. Mackay et al., Tissue Eng. 4, 415-28, 1998; J. U. Yoo et al., J. Bone Joint Surg. Am. 80A, 1745-57, 1998)。骨細胞への分化は、例えば 10%ウシ胎児血清の存在下、デキサメタゾン、 $\beta$ -グリセロールリン酸、およびアスコルビン酸で誘導することができる (S. A. Kuznetsov et al., J. Bone Miner. Res. 12, 1335-47, 1997; D. J. Prockop Science 276, 71-4, 1997; C. M. Thompson and R. A. Young, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4587-90, 1995; A. I. Caplan, J. Orthop. Res. 9, 641-50, 1991; A. J. Friedenstein, Int. Rev. Cytol. 47, 327-59, 1976; M. Owen and A. J. Friedenstein, in "Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues", D. Evered and S. Harnett, Eds., Wiley, Chichester, UK, 1988, pp. 42-60; S. P. Bruder et al., J. Cell. Biochem. 64, 278-94, 1997; N. Jaiswal et al., J. Cell. Biochem. 64, 295-312, 1997; S. P. Bruder et al., J. Bone Miner. Res. 13, 655-63 1998)。

また、生体内においても、例えば未分化間葉系細胞の子宮内 (in utero) への移植により、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞、心筋細胞、骨髄間質細胞、胸腺間質細胞へ分化させることができる (K. W. Liechty et al., Nature Medicine 6, 1282-1286, 2000)。これらの方法により、分離された未分化間葉系細胞から、試験管内

または生体内において組織を再構築させることができる。再構築された組織や器官は、再生医学的応用が期待される。

また、シノビオリンは、リウマチ滑膜細胞で強発現していることから、リウマチ滑膜細胞に対する細胞マーカーとしても用いられ得る。本発明の抗体を細胞の分離または検出用試薬として用いる場合には、抗体を他の溶媒や溶質と組み合わせて組成物とすることができる。例えば、蒸留水、pH緩衝試薬、塩、タンパク質、界面活性剤などを組み合わせることができる。

シノビオリンはRA患者の滑膜組織において強発現している。また、RA患者の血中においては、シノビオリンを認識する抗体（自己抗体）が高い頻度で検出される。他方健常者の血中では、シノビオリンの抗体は実質的に検出することができない。更にシノビオリンは、インビトロにおいて培養滑膜細胞の増殖を抑制する。これは、滑膜細胞の増殖を促進するリガンドに対して、シノビオリンが競合するためであると考えられる。これらの情報を基に、次のような機序が予想できる。すなわち、シノビオリンの滑膜細胞における強発現が、滑膜細胞に対して増殖促進作用を持つシノビオリンのリガンドとの結合を促し、結果として滑膜細胞の増殖が促進される。そしてこの滑膜細胞の異常増殖こそがRAの病態に他ならない。

以上の知見に基づいて、本発明は次の工程を含む、慢性関節リウマチの検出方法、あるいは診断方法を提供する。

- i) 被検者の生体試料中に存在するRAのマーカーを検出する工程、および
- ii) ii) 工程 i)の検出結果を、RAと関連付ける工程

本発明におけるRAの検出方法、あるいは診断方法におけるマーカーは、以下に示すいずれかのマーカーを用いることができる。これらのマーカーの測定方法は、既に述べたとおりである。

- ・シノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なポリヌクレオチド、
- ・シノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なタンパク質、
- ・シノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なペプチド、

- ・シノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なタンパク質に結合する抗体、および

- ・シノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なペプチドに結合する抗体

たとえば、患者から採取された血液試料中に、シノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なタンパク質もしくはペプチドと反応する抗体が見出されれば、その患者はRAである可能性が高い。あるいは、患者から採取された滑膜組織におけるシノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なタンパク質の発現は、RAに起因する滑膜組織の増成を示している。蛋白質の発現は、蛋白質やmRNAの存在を指標として検出することができる。

また上記のような機序に基づいて、本発明のシノビオリンとその遺伝子の提供により、RAの治療薬開発の新たなアプローチがもたらされる。まず本発明のシノビオリンにより、シノビオリンに対する結合活性を指標としてシノビオリンのリガンドを検出することができる。すなわち本発明は、以下の工程を含むシノビオリンに対する結合活性の検出方法に関する。

- a) 被験化合物を、シノビオリンもしくはシノビオリンと機能的に同等なタンパク質、またはペプチドと接触させる工程、および
- b) 被験化合物と前記タンパク質またはペプチドとの結合を観察する工程

更に上記検出方法に基づいて、シノビオリンに対するリガンドのスクリーニングが可能となる。本発明のスクリーニング方法は、具体的には次の工程を含む。

- a) 上記のシノビオリンに対する結合活性の検出方法によって、被験化合物のシノビオリンもしくはシノビオリンと機能的に同等な蛋白質に対する結合活性を検出する工程、および
- b) 対照と比較して前記結合活性が高い被験化合物を選択する工程

リガンドの候補化合物は、天然の物質やその変異体のみならず、低分子の有機化合物であっても良い。前記タンパク質と候補化合物の結合については、候補化合物を標識しておけば直接検出することができる。あるいは既知のSLとの結合阻害を指



標として確認することも可能である。すなわち、S1-5のような本発明の蛋白質との結合活性を有することが明らかな分子の共存下で、候補化合物と本発明の蛋白質を接触させるのである。あるいは、候補化合物と本発明の蛋白質の接触後に、更にSLを接触させることによって、候補化合物の結合活性を評価することもできる。結合阻害を指標とする場合には、標識の必要なのはこの既知のSLのみとなるので、簡便なスクリーニング法となる。

対照としては、被験化合物の不存在下で工程a)と同じ操作を行うことが好適である。あるいは、工程a)に比べ、被験化合物をより低い濃度で含む場合であってもよい。また、例えば被験化合物の代わりにシノビオリンに結合することが分かっている分子を用いて工程a)と同じ操作を行い、その分子よりもより高い結合活性を持つ化合物を選択することもできる。

この他実施例に示した遺伝子に基づくリガンドのスクリーニング法が可能である。例えば市販の Two-hybrid system を利用し、候補リガンドをコードする遺伝子を含むライブラリーからシノビオリンに結合するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。この方法は、天然のリガンドをスクリーニングするときには有用な方法である。あるいは、cDNAを組み込んだファージライブラリーと標識シノビオリンを用いた発現スクリーニングによりリガンドをクローニングすることも可能である。本発明者らは、このスクリーニング方法によって、シノビオリンの天然リガンドであるSLを発見した。SLは、滑膜細胞表面にあるシノビオリンに結合して細胞増殖を刺激している可能性があるので、SLの血中レベルの測定がRAの病態と関連する可能性がある。SLは、シノビオリンとの結合活性に基づいて、測定することができる。もちろん抗SL抗体によりイムノアッセイを行うことも可能であるし、両者を組み合わせたサンドイッチ法によってSLを測定することもできる。

本発明者らは、シノビオリンを培養滑膜細胞に添加すると、細胞増殖に対して抑制的に作用することを確認した。これを、培地中のSLの中和で説明すると、シノビ

オリンとそのリガンドとの結合を阻害することが滑膜細胞の異常増殖抑制につながり、結果としてRAの治療効果をもたらすものと考えられる。本発明のスクリーニング方法によって得ることができるリガンドは、シノビオリンとその天然リガンドとの結合を競合的に阻害するので、RAの滑膜細胞の増殖を効果的に抑制する活性（アンタゴニスト）を期待できる。

また本発明のスクリーニング方法によって得ることができるシノビオリンのリガンドには、上記SLと同様にシノビオリンの活性を刺激する活性（アゴニスト）が期待できる。シノビオリンを刺激するリガンドは、シノビオリン刺激剤、あるいは骨形成促進剤として有用である。より具体的には、シノビオリンを刺激するリガンドは、骨粗鬆症、骨折、あるいはスポーツ外傷等の治療薬として利用することができる。

これらの結合活性の検出方法、並びにスクリーニング方法を発展させ、更に本発明はシノビオリン、またはその機能的に同等なタンパク質とシノビオリンリガンドとの結合を阻害する活性の検出方法、および化合物のスクリーニング方法を提供する。本発明に基づく、シノビオリンとシノビオリンリガンドとの結合を阻害する活性の検出方法は以下の工程を含む。

- a) 被験化合物存在下で、シノビオリンもしくはシノビオリンと機能的に同等な蛋白質またはペプチドとそのリガンドとを接触させる工程、および
- b) 前記タンパク質またはペプチドに結合するリガンド、および／または被験化合物を検出する工程

そして上記検出方法に基づいて、シノビオリン、またはその機能的に同等なタンパク質とシノビオリンリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法が提供される。すなわち本発明は、以下のスクリーニング方法に関する。

- a) 上記検出方法に基づいて、被験化合物のシノビオリンもしくはシノビオリンと機能的に同等な蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を検出する工程、および

b) 対照と比較して前記阻害活性が高い被験化合物を選択する工程

対照としては、被験化合物の不存在下で工程 a) と同じ操作を行うことが好適である。あるいは、工程 a) に比べ、被験化合物をより低い濃度で含む場合であってもよい。また、例えば被験化合物の代わりに、シノビオリンとそのリガンドとの結合を阻害することが分かっている分子を用いて工程 a) と同じ操作を行い、その分子よりもより高い結合活性を持つ化合物を選択することもできる。

このスクリーニングにより、シノビオリンまたはその機能的に同等なタンパク質に対するアンタゴニストとして作用する化合物を得ることもできる。シノビオリンのリガンドとしては、例えば実施例に記載の SL (S1-5) を用いることができる。具体的には accession number AAA65590、I38449、NP\_061489、NP\_004096、または Q12805 に特定される S1-5 タンパク質や、シノビオリンタンパク質に結合する活性を有する限り、それらに類似したタンパク質を用いることができる (Lecka-Czernik, B. et al., Mol. Cell. Biol. 15, 120-128, 1995; Heon, E. et al., Arch. Ophthalmol. 114, 193-198, 1996; Ikegawa, S. et al., Genomics 35, 590-592, 1996; Katsanis, N. et al., Hum. Genet. 106, 66-72, 2000; Giltay, R. et al., Matrix Biol. 18, 469-480, 1999; Stone, E. M. et al., Nat. Genet. 22, 199-202, 1999)。シノビオリンとシノビオリンリガンドとの接触は、候補化合物を適用する前もしくは後、または同時に行うことができる。

ここでスクリーニングすべき化合物としては、シノビオリン側に結合してリガンドとの結合をブロックするものと、リガンド側をブロックするものが考えられる。シノビオリン側に結合する化合物をスクリーニングするには、リガンドを標識しておき候補化合物と競合させると良い。リガンド側に結合する化合物が候補となっていれば、その逆となる。いずれのスクリーニングにおいても、標識に当たっては放射性同位元素を用いるのが、活性に対する影響が小さいため望ましい。こうして得ることができるシノビオリンのアンタゴニストについても、滑膜細胞の増殖を抑制する作用を持つものと推測され、RA の治療効果を期待できる。

また、シノビオリンリガンドであるS1-5は、Malattia Leventinese (ML) および Doyme honeycomb retinal dystrophy (DHRD) の原因遺伝子であることが示唆されている (Stone, E. M. et al., Nature Genetics 22, 199-202, 1999)。これらの疾患は、結晶腔 (drusen) と呼ばれる沈着物を生じ、加齢黄斑変性症 (age-related macular degeneration; AMD) と類似した症状を示す。これらのことから、シノビオリンもまた、MLおよびDHRDに関与している可能性がある。シノビオリンの変異や多型の検査により、MLおよびDHRDの診断を行うことが考えられる。また、本発明のスクリーニングによって得られる、シノビオリンのリガンドとして作用する化合物や、シノビオリンとS1-5との相互作用を阻害する化合物等は、これらの疾患の予防や治療に貢献する医薬としての利用が期待される。

また、本発明のシノビオリンを用いて、化合物のシノビオリンによるシグナル伝達を調節する活性を評価したり、あるいはシノビオリンによるシグナル伝達を調節する化合物をスクリーニングすることができる。具体的には本発明は、次の工程を含む、被験化合物のシノビオリンによるシグナル伝達を調節する活性を検出する方法を提供する。

- a) シノビオリンリガンドの存在下または不存在下で、被験化合物とシノビオリンを接触させる工程、および
- b) シノビオリンを介するシグナル伝達を検出する工程

また本発明は、次の工程を含む、シノビオリンによるシグナル伝達を調節する活性を有する化合物のスクリーニング方法に関する。

- a) 前記の方法によって、被験化合物のシノビオリンによるシグナル伝達を調節する活性を検出する工程、および
- b) 対照と比較して前記調節の活性が高い被験化合物を選択する工程

対照としては、被験化合物の不存在下で工程 a) と同じ操作を行うことが好適である。あるいは、工程 a) に比べ、被験化合物をより低い濃度で含む場合であってもよい。また、例えば被験化合物の代わりに、シノビオリンによるシグナル伝達を

促進または阻害する活性を有することが分かっている分子を用いて工程 a) と同じ操作を行い、その分子よりもより高い調節活性を持つ化合物を選択することもできる。

本発明において、シノビオリンによるシグナル伝達とは、シノビオリンに与えられた刺激が、異なる分子に伝えられることを言う。刺激の種類は限定されない。生体におけるシグナル伝達には、多くの様式が存在することが知られている。代表的なシグナル伝達は、蛋白質の修飾による活性の調節である。たとえば、ある種の蛋白質は、リン酸化やアセチル化によって、その蛋白質の活性が調節されている。また蛋白質の切断によって、その活性が制御されるものも知られている。蛋白質の切断をより特異的に行うために、ユビキチンのような分子の存在が重要である。シグナル伝達は、シグナルの伝達によって生じるシグナル伝達を構成する分子の活性や構造の変化を指標として検出することができる。あるいは、シグナル伝達のための複合体の形成を指標として、シグナル伝達を検出することもできる。

シグナル伝達としては、特にリン酸化または脱リン酸化シグナルが挙げられる。細胞増殖シグナルの多くは蛋白質リン酸化または脱リン酸化による蛋白質修飾を介して下流のシグナル分子に伝達されることが知られている。本発明のシノビオリンも細胞増殖作用を有することから、シノビオリンを介したシグナル伝達もまた蛋白質のリン酸化により伝達されることが示唆される。実際、本発明者らは、シノビオリン発現によるリン酸化作用を見出した。従って、シノビオリンを介するシグナル伝達を、蛋白質のリン酸化の検出により測定することができる。

細胞増殖または分化に関わる受容体は、その酵素活性部位として次のようなドメインを有している（実験医学別冊、Bioscience用語ライブラリー、改訂版サイトカイン・増殖因子、羊土社、1998年発行）。

チロシンキナーゼドメイン（VEGF受容体、PDGF受容体、HGF受容体、EGF受容体など）、

チロシンホスファターゼドメイン（RPTPなど）、または

セリン/スレオニンキナーゼドメイン (TGF $\beta$ 受容体など)

シノビオリンもこれらの酵素活性を直接または間接的に保持していると予想される。酵素活性を間接的に有するとは、シノビオリン分子内に酵素活性サイトは持たないが、シノビオリンに会合する分子が酵素活性を持つことを言う。このような分子としては例えばTNF受容体やGM-CSF受容体などが知られている。したがって、例えばチロシン、セリン、および/またはスレオニンのリン酸化活性を検出することにより、シノビオリンによるシグナル伝達を評価することができる。このとき、シノビオリンリガンドの存在下で、被験化合物の作用を評価することにより、シノビオリンリガンドによってトリガーされるシノビオリンのシグナル伝達に与える被験化合物の影響を評価することができる。具体的には、シノビオリンリガンドによるシノビオリンに対するシグナル伝達を阻害、または抑制する活性を検出することができる。シノビオリンリガンドとしては、本明細書において述べられたシノビオリンリガンドS1-5を用いることができる。あるいはシノビオリンリガンドの不存在下で被験化合物の作用を評価することにより、被験化合物によるシノビオリンに対する刺激活性を評価することもできる。

蛋白質のリン酸化を検出するには、シノビオリンリガンドの存在下または不存在下で、例えば被験化合物および [ $^{32}$ P]正リン酸とともにシノビオリン発現細胞をインキュベートする。次いでこの細胞の溶解物から免疫沈降によりリン酸化された蛋白質を回収する。回収した蛋白質はSDS-PAGEで展開後、オートラジオグラフィーにより、リン酸化を検出することができる。リン酸化アミノ酸は、TLCやその他の公知のペプチド分析により同定することができる。

あるいは、リン酸化チロシン抗体など、リン酸化蛋白質に対する特異的抗体を用いて特定のアミノ酸のリン酸化を検出することもできる。

一般に、細胞内におけるシグナル伝達因子のリン酸化は、次々に複数の分子に伝達される。つまり一連の伝達経路は、カスケードを構成している。そのため、細胞内の蛋白質全体のリン酸化レベルの変化を評価することによって、その細胞に起き

たリン酸化シグナルの大きさを比較することができる。細胞内の全蛋白質を対象にリン酸化レベルを評価する方法は公知である。たとえば、細胞をシノビオリンリガンド等で刺激後、タンパク質をSDS-APGEで展開し、フィルターにプロットした後、抗リン酸化チロシン抗体などを用いたウエスタンブロットによって蛋白質全体のリン酸化レベルを評価することができる。また、例えば $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸で細胞を標識し、細胞をシノビオリンリガンド等で刺激後、細胞タンパク質を二次元電気泳動で展開する。タンパク質をクマシーブルーで染色し、オートラジオグラフィーを行う。リン酸化されたスポットを検出することにより、リン酸化レベルを評価することができる。

あるいは、シノビオリンの基質となるリン酸化蛋白質におけるリン酸化のレベルの変化を特異的に測定することもできる。シノビオリンの基質となるリン酸化蛋白質は、たとえば上記の二次元電気泳動においてリン酸化されたスポットを回収し、マイクロシーケンスやマスマスペクトロメトリーによって同定することができる。同定された基質蛋白質のリン酸化レベルの変化は、例えば基質蛋白質に対する特異抗体を用いて免疫沈降を行い、SDS-APGEで展開後、 $[^{32}\text{P}]$ の取り込みをオートラジオグラフィーで測定したり、あるいは抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタンブロットティングなどによって評価することができる（バイオマニュアルシリーズ 分子生物学研究のためのタンパク実験法 竹縄忠臣 稲垣昌樹 編）。

上記方法に用いる細胞としては、滑膜細胞（例えばRTF）や外来的にシノビオリン遺伝子を導入した細胞などが挙げられる。被験化合物によりシノビオリンによるリン酸化または脱リン酸化のレベルが低下すれば、この化合物はシノビオリンによるシグナル伝達を阻害する化合物と判断される。また被験化合物によりシノビオリンによるリン酸化または脱リン酸化のレベルが上昇すれば、この化合物はシノビオリンによるシグナル伝達を促進する化合物と判断される。

例えばシノビオリンが受容体型チロシンキナーゼとして機能し、チロシンリン酸化を介して下流の分子を活性化しシグナルを伝達する場合、被験化合物によりチロ

シノビオリン酸化が抑制されれば、この化合物はシノビオリンによるシグナル伝達を阻害する化合物と判断される。また本発明は、例えばチロシンキナーゼ、チロシンホスファターゼ、またはセリン/スレオニンキナーゼなどの蛋白質キナーゼまたはホスファターゼの阻害剤を用いて、シノビオリンによるシグナル伝達を阻害する方法にも関する。

また、シノビオリンによるシグナル伝達の好適な他の一例としては、ユビキチン化シグナルが挙げられる。蛋白質構造予測システム (SMART: Simple Modular Architecture Research Tool (ウェブサイトも参照 <http://smart.embl-heidelberg.de/>) Schultz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857-5864, 1998; Schultz et al., Nucleic Acids Res. 28, 231-234, 2000) により、シノビオリンに Ring finger モチーフ (Joazeiro, C. A. et al., Science 286, 309-312, 1999) の存在が示された。このモチーフは蛋白質の分解に関わるE3ユビキチン-蛋白質リガーゼに存在することが知られている。またRing finger モチーフは、E2ユビキチン結合酵素の結合部位と考えられている。

従って、シノビオリンによるユビキチン化シグナルを検出することにより、シノビオリンによるシグナル伝達を評価することができる。ユビキチン化シグナルは、例えば抗ユビキチン抗体を用いて基質蛋白質のユビキチン化を検出することにより、評価される。また、シノビオリンとE2ユビキチン結合酵素または基質蛋白質との結合、あるいはシノビオリンを含むユビキチンリガーゼ複合体などを検出してもよい。具体的には、例えばタグを付けたシノビオリンを発現するベクターをトランスフェクションした細胞を破碎し、 $[^{32}\text{P}]$  標識ユビキチンを添加し反応後、抗タグ抗体により免疫沈降する。SDS-PAGEにより展開し、オートラジオグラフィーを行うことによりシノビオリンのユビキチンリガーゼ活性を検出することができる (Hashizume, R. et al., J. Biol. Chem. 276, 14537-14540, 2001)。

シノビオリンの基質蛋白質におけるユビキチン化のレベルの変化を特異的に測定することもできる。シノビオリンの基質蛋白質は、たとえばシノビオリンをベ



トとした酵母two-hybridスクリーニングなどによって同定することができる。同定された基質蛋白質のユビキチン化レベルの変化は、タグつき基質を精製し、そこに、精製したE1、E2、E3およびユビキチンを添加し、反応後、抗タグ抗体で免疫沈降し、抗ユビキチン抗体による染色によって評価することができる (Yokouchi, M. et al., J. Biol. Chem. 274, 31707-31712, 1999)。

被験化合物によりシノビオリンによるユビキチン化シグナルの活性化が低下すれば、この化合物はシノビオリンによるシグナル伝達を阻害する化合物と判定される。また被験化合物によりシノビオリンによるユビキチン化シグナルの活性化が上昇すれば、この化合物はシノビオリンによるシグナル伝達を促進する化合物と判定される。例えばシノビオリンとE2ユビキチン活性化酵素との相互作用を阻害する化合物は、シノビオリンによるユビキチン化シグナルを有効に阻害することができる。また本発明は、ユビキチン化シグナルに関与する酵素の阻害剤を用いて、シノビオリンによるシグナル伝達を遮断する方法を提供する。例えばE2ユビキチン結合酵素、あるいはE3ユビキチンリガーゼの阻害剤を細胞に適用することにより、シノビオリンによるシグナル伝達を阻害することも可能である。

以上のような方法によりシノビオリンを介するシグナル伝達を調節する活性を有する化合物を選択することができる。シノビオリンによるシグナル伝達を阻害する化合物は、シノビオリンの活性化に起因する疾患の治療剤として有用である。例えばシノビオリンによるシグナル伝達を阻害する化合物は、滑膜増生阻害として有用である。この化合物を投与することにより滑膜増生を抑制することができ、これによりRAなどの滑膜増生を伴う疾患の予防および治療を行うことが可能となる。また、これらの化合物はMLおよびDHRDに対する医薬としても用いられ得る。あるいは、このシグナル伝達を促進する化合物は、シノビオリン刺激剤、あるいは骨形成促進剤などに用いることができる。例えば、骨粗鬆症、骨折、あるいはスポーツ外傷等の治療薬として利用され得る。

シノビオリン遺伝子の発見に基づいて、たとえば次のようなRAおよびシノビオリ

ンが関与するその他の疾患に関する新たな研究が可能となる。まず、シノピオリンの発現を制御しているプロモーターやエンハンサーの構造決定が可能となる。すなわち、配列番号：1に示したシノピオリン遺伝子の塩基配列をもとにゲノムのクローニングを進め、発現制御領域の配列を分析することができる。その結果得られるシノピオリンの転写調節領域は、シノピオリンの転写調節因子の探索に利用することができる。

また、本発明のシノピオリンノックアウト動物において、マーカー遺伝子をノックインし、シノピオリン遺伝子の内因性プロモーターの制御下にマーカー遺伝子を発現させれば、この動物またはこの動物由来の細胞を用いて、マーカー遺伝子の発現を指標にシノピオリン遺伝子の発現を制御する薬剤をスクリーニングすることができる。例えば転写調節因子の認識配列を2本鎖として与えれば、デコイ核酸医薬として機能する。

また、本発明のポリヌクレオチドを用いて、動物における本発明の蛋白質の生物学的な役割を調べることが可能である。このためには、例えば本発明のDNAを導入して、本発明の蛋白質を過剰発現または異所発現（または異時発現）させ、その効果を検証することによってその役割を調べることができる。遺伝子を全身に導入するには、本発明のDNAのトランスジェニック動物を作製すればよい。あるいは、ジーンターゲットイングやアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム等の投与により本発明のDNAの発現や機能を抑制する loss-of-function（機能喪失）実験も有効である。すなわち本発明は、本発明のDNAの発現が改変されているか、または該改変を誘導することができるトランスジェニック非ヒト脊椎動物を提供する。発現の改変は、野生型と比較して改変されていてもよく、改変を誘導する場合においては、誘導前と比較して改変していてもよい。

本発明においてトランスジェニック動物とは、外来的に核酸がゲノムに導入された動物が含まれる。また、「DNAの発現」とは、DNAの転写レベルであってもよく、その転写産物の翻訳レベルであってもよい。また「改変を誘導する」とは、例えば

外的な刺激や時期特異的に発現の改変が誘導されたり、掛け合わせによる後代において発現が改変されることを含む。また、一部の細胞または組織における発現の改変も含まれる。本発明のトランスジェニック非ヒト脊椎動物としては、哺乳動物（例えばマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ならびにウシ等）が好ましく、特にげっ歯類、例えばマウスまたはラットなどを用いることが好適である。

本発明のトランスジェニック非ヒト脊椎動物には、本発明の蛋白質をコードするDNAが外来的に導入されているトランスジェニック非ヒト脊椎動物が含まれる。このようなトランスジェニック動物は、例えば本発明の蛋白質をコードするDNAを発現するベクターを、受精卵に導入することにより製造することができる。

ベクターの導入は、ベクターと卵を混合後リン酸カルシウムによる処理、エレクトロポレーション、または倒立顕微鏡下におけるマイクロインジェクション法等により行うことができる。または、胚性幹細胞（ES細胞）に本発明のベクターを導入し、選別したES細胞を受精卵（胚盤胞）にマイクロインジェクションにより導入してもよい。

得られた受精卵は、輸精管結紮雄個体との交配により偽妊娠させたレシピエントの卵管内に移植し、産仔を得ることができる。産仔の尾などからDNAを調製し、PCRにより導入DNAの保持を確認する（Brigid Hogan et al. eds., "Manipulating the Mouse Embryo : A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1994, Gordon, J. W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384, 1980; Jaenisch, R. and B. Mintz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1250-1254, 1974）。生殖系列に遺伝子が導入されたキメラ動物からは、正常動物と交配することによりヘテロ接合体が得られる。ヘテロ接合体同士の交配によりホモ接合体を得ることができる。本発明のトランスジェニック非ヒト脊椎動物には、これらの子孫も含む。

本発明のDNAを生体内で発現させるために用いるプロモーターとしては、例えば

全身発現性のプロモーターや、その他の組織特異的、時期特異的プロモーターを用いることができる。

全身性プロモーターとしては、例えば $\beta$ アクチンプロモーター等が挙げられる。例えば、pCAGGS等に含まれている、ヒトサイトメガロウイルスエンハンサーが連結されたニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターを用いることができる。部位特異的または時期特異的に本発明のDNAを発現するトランスジェニック動物を作製する場合、Cre-loxPの系などを利用することが可能である。例えば、部位特異的または時期特異的なプロモーターの下流にCreリコンビナーゼ遺伝子を有するトランスジェニック動物を作製し、別に汎用プロモーターの下流に本発明のポリペプチドをコードするDNAを連結させたベクターを保持するトランスジェニック動物を作製する。この時、プロモーターと本発明のポリペプチドをコードするDNAとの間に一对のloxPに挟まれたストップコドンまたは転写終結シグナル等を挿入しておく。2つの個体を掛け合わせることで、Creの発現に伴って本発明のポリペプチドを発現させることができる。

また、本発明のトランスジェニック非ヒト脊椎動物には、内因性の本発明の蛋白質をコードするDNAの発現が抑制されているトランスジェニック非ヒト脊椎動物が含まれる。このようなトランスジェニック動物は、例えば、ジーンターゲティングにより製造することができる。このようなトランスジェニック非ヒト脊椎動物を作製するには、例えば本発明のDNAの一部または全部を置換、欠失、付加および／または挿入等により欠損させたターゲティングベクターを胚性幹(ES)細胞に導入し、染色体DNAと相同組み換えを起した細胞を選択する。相同組み換え体の選択のためには公知のポジティブ・ネガティブ選択を行うことができる。ポジティブ選択用マーカーとしては、ネオマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子、ネガティブ選択用マーカーとしては、ジフテリア毒素(DT)-A遺伝子や HSV-tk遺伝子などが挙げられる。サザンブロッティングやPCR等により、正しく組み換えられた細胞を選択することができる。得られた細胞は、8細胞期程度の受精卵または胚盤胞の胚盤胞腔

などに注入し、輸精管結紮雄と交配させて作製した偽妊娠メス個体の子宮内に移植する。産仔のゲノムDNA解析は上記と同様に行い、ヘテロ接合体およびホモ個体を得ることができる。目的の遺伝子をノックアウトするだけでなく、他の遺伝子をノックインすることもできる。ノックインする遺伝子に特に制限はない。例えばlacZ遺伝子等のマーカー遺伝子が挙げられる。

また、内因性の本発明の蛋白質をコードするDNAの発現が抑制されているトランスジェニック非ヒト脊椎動物は、アンチセンス法またはリボザイム法を利用して作製することもできる。アンチセンス法においては、本発明の蛋白質をコードするDNAの転写産物に相補的なRNAをコードするDNAを含むベクターを、また、リボザイム法においては、例えば本発明の蛋白質をコードするDNAの転写産物を切断するRNAをコードするDNAを含むベクターを、上記と同様に哺乳動物の胚性幹細胞に導入し、これを哺乳動物の胚に注入し、該胚から個体を得ればよい。

シノビオリンがRAの滑膜細胞増殖症状をもたらしていることから、トランスジェニック動物には次のような用途が考えられる。すなわち、シノビオリン遺伝子、あるいはSLの遺伝子を、適当な動物に組み込んでトランスジェニック動物とし、これを強発現させればRAのモデルとすることができる。このトランスジェニック動物において、滑膜増殖機構を制御する薬剤のスクリーニングを進めることが可能となる。あるいは、ヒトのシノビオリン/SLでRA症状を起こさない動物においては、これらの遺伝子を強発現させることで、シノビオリンやSLの供給源として活用することも可能である。

シノビオリン遺伝子を発現するトランスジェニック動物は、滑膜増生を伴う関節炎など、RAと共通する症状を起す。すなわちこの動物は慢性関節リウマチモデル動物となる。この動物を用いて、RAに対する医薬候補化合物を含む、種々の化合物の試験またはスクリーニングを行うことができる。被験化合物をトランスジェニック動物に投与し、症状の寛解または増悪を観察して化合物の効果を検証したり、あるいはスクリーニングを行うことができる。本発明のトランスジェニック動物を利用

した試験またはスクリーニングの方法としては、以下の方法が挙げられる。

関節異常を寛解または増悪させる化合物を試験またはスクリーニングする方法であって、(a) 本発明のDNAが外来的に導入されているトランスジェニック非ヒト脊椎動物に被験化合物を投与する工程、および(b) 投与された動物の関節異常を評価する工程、を含む方法。

またシノビオリン遺伝子のノックアウト動物は、シノビオリンの作用の抑制による副作用を調べたり、その副作用を低減する薬剤のアッセイやスクリーニングに利用することができる。またノックアウト動物に局所的、または一過的にシノビオリンを発現させ、シノビオリンの効果を特異的に検証することもできる。また、SL(S1-5)とML/DHRDとの関連より、シノビオリンがSLの細胞内シグナル伝達に関与する可能性があることにより、シノビオリンノックアウト動物は、MLおよびDHRDのモデルとなり得る。例えば組織特異的、時期特異的にシノビオリン遺伝子を(ホモまたはヘテロに)ノックアウトすることが考えられる。

シノビオリン遺伝子のノックアウト時にマーカー遺伝子等を導入したノックイン動物を用い、化合物のシノビオリン遺伝子の発現を上昇または下降させる活性を検出することができる。すなわち本発明は、以下の工程を含む被験化合物のシノビオリン遺伝子の発現を調節する活性の検出方法に関する。

a) 被験化合物を前記ノックイン動物またはノックイン細胞に適用する工程、および

b) マーカー遺伝子の発現レベルを測定する工程、

この検出方法は、シノビオリン遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニングに利用することができる。この方法は、シノビオリン遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニング方法であり、a) 上記ノックイン動物またはノックイン細胞に、被験化合物を適用する工程、b) マーカー遺伝子の発現レベルを測定する工程、およびc) ノックインされた遺伝子の発現を上昇または低下させる化合物を選択する工程、を含む方法である。

すなわち、被験化合物を適用した動物または細胞において、マーカー遺伝子の発現を検出し、マーカー遺伝子の発現を上昇または低下させる化合物を選択する。LacZをマーカーに用いた場合のマーカー遺伝子の発現の検出は、実施例に記載の方法により行うことができる。この方法により、個体を用いた試験やスクリーニングに加え、例えば器官や組織を単離して用いたり、トランスジェニック動物から得られた細胞を用いて同様の試験やスクリーニングを行うことも可能である。

個体を用いたスクリーニングにおいては、被験化合物は、適当なルートを介して投与される。被験化合物は、例えば静脈注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注入、経口投与、経腸投与、経鼻投与などの公知の投与方法により投与され得る。試験管培養系を用いてスクリーニングを行う場合は、被験化合物は例えば培地中に添加される。または、マイクロインジェクション等により細胞内に注入されてもよい。被験化合物が遺伝子である場合は、naked DNAとして、所望のトランスフェクション試薬と組み合わせて、あるいは公知の発現ベクターに組み込んで細胞に遺伝子を導入することができる。シノビオリン遺伝子のプロモーター領域の配列を含む核酸は、デコイとして作用し、シノビオリンの発現を抑制することが期待される。

シノビオリン遺伝子の発現を調節する活性は、たとえば以下の工程によって検出することができる。

- a) シノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なポリヌクレオチドの内因性プロモーターの制御下にレポーター遺伝子を発現することができる発現系に、被験化合物を接触させる工程、および
- b) レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程

そしてこの検出方法に基づいて、シノビオリン遺伝子の発現を調節する化合物をスクリーニングすることができる。すなわち本発明は、以下の工程を含む、シノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なポリヌクレオチドの内因性プロモーターの活性を調節する化合物のスクリーニング方法に関する。

- a) 前記活性の検出方法に基づいて、被験化合物のシノビオリンまたはシノビオ

リンと機能的に同等なポリヌクレオチドの内因性プロモーターの活性を調節する活性を測定する工程、および

b) 対照と比較して、前記活性に差がある被験化合物を選択する工程

対照としては、被験化合物の不存在下で工程 a) と同じ操作を行った場合、あるいは工程 a) に比べ被験化合物をより低い濃度で含む場合などが挙げられる。また、例えば別の化合物を用いて工程 a) と同じ操作を行い、その化合物よりもより高い作用を持つ化合物を選択することもできる。遺伝子の発現には、転写レベルの発現、および翻訳レベルの発現が含まれる。シノビオリン遺伝子の内因性プロモーターの下流に結合されている遺伝子は、天然のシノビオリン遺伝子自体であってもよく、人工的に連結されたレポーター遺伝子であってもよい。シノビオリン遺伝子の内因性プロモーター活性は、例えば下流に連結されている遺伝子の cDNA 断片をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、該遺伝子がコードする蛋白質に対する抗体を用いたウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA 等により、該遺伝子の転写産物または翻訳残物を検出することにより行うことができる。

また、シノビオリン遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を結合した構築物を作製すれば、これを細胞にトランスフェクションして得られた形質転換細胞を用いて、レポーター遺伝子の発現を指標にスクリーニングを行うこともできる。このような構築物は、シノビオリン遺伝子のプロモーターを含むシノビオリン遺伝子上流領域のゲノム DNA の下流に、所望のレポーター遺伝子を連結させることにより作製することができる。レポーター遺伝子に特に制限はなく、LacZ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、GFP (green fluorescent protein) 等を挙げることができる。シノビオリン遺伝子の発現を低下させる化合物は、RA の治療薬の候補となる。

本発明の試験またはスクリーニングに用いる被験化合物としては特に制限はなく、無機化合物、有機化合物、ペプチド、蛋白質、天然または合成低分子化合物、天然または合成高分子化合物、組織または細胞抽出液、微生物の培養上清や、植物、



海洋生物由来の天然成分などが挙げられるがこれらに制限されない。遺伝子ライブラリーの発現産物または発現cDNAライブラリーなどを用いることもできる。また、上述した、シノビオリンに結合する化合物のスクリーニングや、シノビオリンとSLとの結合を阻害する化合物のスクリーニングにより得られた化合物を被験化合物として投与することもできる。

化合物の投与方法は特に制限はなく、*in vitro*であれば、培養液への添加を含む細胞への接触、マイクロインジェクターやトランスフェクション試薬を用いた細胞への導入などにより実施することができる。*in vivo*であれば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射、腹腔内投与、経口投与、経腸投与、筋肉内投与、点眼、経鼻投与、関節等への局所注入など当業者に公知の方法により行いうる。化合物は、適宜組成物として投与される。例えば水、生理食塩水、緩衝液、塩、安定剤、保存剤、懸濁剤などと混合され得る。

また、シノビオリン遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニングは、トランスジェニック動物ではなく通常の動物またはその動物に由来する細胞等を用いて行うことも可能である。たとえば本発明は、以下の工程を含むシノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なポリヌクレオチドの発現を調節する活性の検出方法に関する。

- a) 被験化合物の存在下で、シノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なポリヌクレオチドを発現する細胞を培養する工程、および
- b) 前記ポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

そしてこの検出方法に基づいて、シノビオリン遺伝子の発現を調節する化合物をスクリーニングすることができる。すなわち本発明は、以下の工程を含む、シノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なポリヌクレオチドの発現を調節する化合物のスクリーニング方法に関する。

- a) 前記活性の検出方法に基づいて、被験化合物のシノビオリンまたはシノビオリンと機能的に同等なポリヌクレオチドの発現を調節する活性を検出する工程、

および

b) 対照と比較して前記活性に差を有する被験化合物を選択する工程

シノピオリンまたはシノピオリンと機能的に同等なポリヌクレオチドの発現レベルは、先に述べたような方法によって測定することができる。またこのスクリーニング方法には、先に述べたようなその他のスクリーニング方法において被験化合物として用いることができるあらゆる化合物を被験化合物とすることができる。対照としては上記と同様、被験化合物の不存在下で工程 a) と同じ操作を行う場合などが挙げられる。

本発明の試験またはスクリーニング方法により同定された化合物は、RAやシノピオリンが関与するその他の疾患に対する医薬の候補となり、RA等の疾患の予防または治療に利用することができる。これらの化合物は、有効成分以外に適宜他の溶質や溶媒と組み合わせて医薬組成物とすることができる。本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。

例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。本発明の医薬組成物は、水溶液、錠剤、カプセル、トローチ、パッカレ錠、エリキシル、懸濁液、シロップ、点鼻液、または吸入液などの形態であり得る。化合物の含有率は適宜決定すればよい。患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射、経口投与、関節内注入、その他の当業者に公知の方法により行いうる。

投与量は、患者の体重や年齢、投与方法、症状などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。一般的な投与量は、薬剤の有効血中濃度や代謝時間により異なるが、1日の維持量として約0.1mg/kg～約1.0g/kg、好ましくは約0.1mg/kg～約10mg/kg、より好ましくは約0.1mg/kg～約1.0mg/

kgであると考えられる。投与は1回から数回に分けて行うことができる。また、該化合物がポリヌクレオチドによりコードされうるものであれば、該ポリヌクレオチドを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抗滑膜細胞抗血清によるイムノスクリーニングにおける陽性コロニーの写真である。

図2は、大腸菌でのシノビオリン組み換えタンパク質の発現を示す写真である。

図3は、試験管内でのシノビオリンcDNAから翻訳されるシノビオリンタンパク質発現を示すオートラジオグラフの写真である。

図4は、シノビオリンのcDNAをプローブとするノーザンブロッティング法によるシノビオリン遺伝子発現の分析結果を示すオートラジオグラフの写真である。

図5は、各種細胞破碎液の抗滑膜細胞抗血清によるウェスタンブロッティング法の結果と、GST-部分シノビオリンによる抗体吸収実験の結果を示す写真である。矢印は吸収されたバンドを示す。各バンドの分子量は上から順に、約220、185、および140kDaであった。

図6は、滑膜細胞破碎液に対する滑膜細胞抗血清を用いたウェスタンブロッティング法の結果を示すオートラジオグラフの写真である。左のレーン（プレイミューン）は滑膜細胞免疫前のウサギ抗血清、右のレーン（免疫後）は滑膜細胞抗血清を用いた。

図7は、滑膜細胞の抗滑膜細胞抗血清（A）および精製抗滑膜細胞抗体（B）による蛍光免疫染色の結果を示す蛍光顕微鏡写真である。

図8は、滑膜組織の抗滑膜細胞抗血清による免疫染色と、GST-部分シノビオリンによる抗体吸収実験を示す顕微鏡写真である。

図9は、滑膜組織の精製抗滑膜細胞抗体による免疫染色の結果を示す顕微鏡写真である。GSTアフィニティーカラムにより精製した抗血清（上パネル）およびGST-部分シノビオリンアフィニティーカラムにより精製した抗血清（下パネル）を用いた結果を示す。

図10は、各種ヒト血清中の抗シノビオリン抗体のウエスタンブロッティング法による検出結果を示すオートラジオグラムの写真である。

図11は、SLのcDNAをプローブとするノーザンブロッティング法による滑膜細胞におけるSL遺伝子の発現を分析した結果を示すオートラジオグラフの写真である。

図12は、 $[^{35}\text{S}]$ ラベルしたHA-シノビオリン-HAHAとGST-SL融合タンパク質との結合を示すオートラジオグラフの写真である。

図13は、滑膜細胞の増殖に対するシノビオリンの影響をMTTアッセイで分析した結果を示す図である。GST-部分シノビオリンを用いた。

図14は、シノビオリン遺伝子導入用ベクターの構造を示す図である。CMVエンハンサーを有する $\beta$ -アクチンプロモーターによりシノビオリンは全身的に発現する。抗Flagタグ（Flag-tag）抗体により、Flagタグ融合シノビオリン蛋白質の発現が確認できる。

図15は、シノビオリン遺伝子のトランスジェニックマウスの関節炎を呈する指関節を示す写真である。シノビオリン強制発現マウスの指の外見および軟X線像を示す。右端に正常マウスの指の軟X線像を比較として示した。シノビオリン強制発現マウスは顕著な指の膨脹を示した。

図16は、シノビオリン遺伝子トランスジェニックマウスの関節炎を呈する指関節の組織学的所見を示す写真である。顕著な膨脹を示した指の関節部分において著しい滑膜増生に伴う骨破壊と異常な骨新生が認められた。

図17は、遺伝子導入マウスの正常な指関節の組織学的所見を示す写真である。関節軟骨の異常、骨破壊および滑膜の増生は認められない。右下パネルは抗Flag抗体による免疫染色の結果を示す。陽性シグナルは観察されない。

図18は、シノビオリン遺伝子トランスジェニックマウスの関節炎を呈する指関節におけるシノビオリンの発現を示す写真である。抗Flag抗体により免疫染色を行った。顕著な膨脹を示した指の関節部位において増生した滑膜組織および軟骨細胞にシノビオリンの発現が認められた。

図19は、シノビオリン遺伝子を欠損させるターゲティングベクターの構造を示す図である。マウスシノビオリン遺伝子断片の翻訳開始点（第一メチオニンを翻訳するATGコドン；“\*”で示す）にlacZ遺伝子を導入し、ポジティブセクションマーカー遺伝子としてネオマイシン耐性（neo）遺伝子を導入した。またジフテリア毒素A（DT-A）遺伝子も結合させネガティブセクションマーカーとした。相同組み換えを起した個体はシノビオリン遺伝子の発現が欠損する代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現し、その酵素活性を利用したLacZ染色により、シノビオリン遺伝子のプロモーターからの発現を検出できる（図22参照）。遺伝子型確認のためのサザンブロット解析（図20参照）に用いたプローブの位置も図示した。

図20は、シノビオリン遺伝子欠損マウスの遺伝子型の解析の結果を示す写真である。生後約2週齢のマウス尾（野生型およびヘテロ欠損マウス）または胎生14.5日胎仔（ホモ欠損マウス）よりDNAを抽出し、PstIで消化後に、図19に示したプローブを用いたサザンブロッティングを行った。

図21は、シノビオリン遺伝子欠損マウスのノーザンブロット解析の結果を示す写真である。野生型（+/+）、シノビオリン遺伝子ヘテロノックアウトマウス（+/-）、およびホモノックアウトマウス（-/-）よりmRNAを抽出し、シノビオリン遺伝子断片をプローブにノーザンブロッティングを行った（上パネル）。下パネルにアガロースゲルのEtBr染色を示した。

図22は、LacZ染色によりシノビオリン発現部位を検討した結果を示す写真である。胎生12.5日齢または胎生13.5日齢の野生型およびヘテロ欠損マウスをLacZにより染色した。シノビオリンの胎生期における発現は、頭頂骨、四肢、耳などの、骨および軟骨が形成される部位に強く認められた。

図23は、四肢形成期におけるシノビオリンの発現を示す写真である。四肢形成期におけるシノビオリンの発現は、FGF4、BMP2、BMP4の発現と同様、Apical Ectodermal Ridge (AER; 外胚葉頂堤) に強く認められた。

図24は、ヘテロ欠損マウスの胎生13日齢の肢芽 (limb bud) の凍結切片のLacZ染色を示す写真である。4時間染色を行った。LacZの青色が未分化間葉系の細胞 (骨・軟骨の原基) に濃染されている。オリジナル倍率 ×40。

図25は、ヘテロ欠損マウスの胎生13日齢の肢芽 (limb bud) の凍結切片のLacZ染色を示す写真である。4時間染色を行った。LacZの青色が未分化間葉系の細胞 (骨・軟骨の原基) に濃染されている。オリジナル倍率 ×200。A, B, および C は、図24に対応する。

図26は、胎生12.5日齢および胎生13日齢におけるシノビオリン遺伝子ホモ欠損マウスの表現型を示す写真である。胎生12.5日齢および胎生13日齢におけるシノビオリン遺伝子ホモ欠損マウスは、ヘテロ欠損マウスと比較し、頭頂部から臀部までの長さが短く、頭蓋や四肢の形成が未熟である傾向が認められた。胎生13日齢のヘテロ欠損マウスと野生型マウスの表現型には、顕著な差は認められなかった。

図27は、胎生14.5日齢におけるシノビオリン遺伝子欠損マウスの表現型を示す写真である。胎生14.5日齢のシノビオリン遺伝子ホモ欠損マウスに肢芽異常が認められた。

図28は、胎生14.5日齢のシノビオリン遺伝子ホモ欠損マウスの後肢におけるLacZの発現 (シノビオリンの発現を反映) を示す写真である。ホモ欠損マウスの異常な後肢においてLacZは、AERおよび未分化間葉系細胞の濃縮部位に発現が認められた。

図29は、胎生15.5日齢のシノビオリン遺伝子欠損マウスの表現型を示す写真である。ホモ欠損マウスは、肢芽異常、上顎、下顎骨の異常、耳の形態異常が認められた。心臓の拍動は認められず、生存していなかった。

図30は、胎生15.5日齢におけるシノビオリン遺伝子欠損マウスの骨格を示す写

真である。アルシヤンブルー、アリザリンレッド染色を示す。アルシヤンブルーによって染色される軟骨およびアリザリンレッドによって染色される石灰化した骨は、シノビオリンホモ欠損マウスに認められなかった。

図31は、シノビオリンノックアウトマウスにおける、抗コラーゲン抗体カクテルを用いたマウス関節炎モデルを示す写真である。野生型マウス [373(+/+)] またはシノビオリンヘテロノックアウトマウス [372(-/+)] に抗コラーゲン抗体カクテルを投与して関節炎を惹起させた (図中 +)。非投与の野生型マウス (-) も観察した [371(+/+)]。その結果、前肢および後肢共に、関節の膨脹および発赤ともに野生型に比べシノビオリンヘテロノックアウトマウスでは軽度であった。すなわち、野生型マウスで誘発される関節炎に比べ、シノビオリンヘテロノックアウトマウスでは関節炎の惹起が弱いことが判明した。

図32は、シノビオリン遺伝子ホモ欠損マウス (13dpc胎仔) の肢芽より得られた初代培養細胞のLacZ染色およびアルシヤンブルー染色を示す写真である。LacZ陽性のコロニー (すなわちシノビオリン発現細胞) とアルシヤンブルー染色陽性のコロニーは一致している。この結果は、骨・軟骨分化にシノビオリンが関与していることを示唆する。継代数1 (p1)。

図33は、13dpcマウス胎仔の肢芽より得られた初代培養細胞のLacZ染色を示す写真である。野生型 (+/+)、シノビオリン遺伝子ヘテロ (+/-) またはホモ (-/-) 欠損マウス由来の細胞が示されている。シノビオリン遺伝子欠損マウス (lacZ遺伝子のノックイン) でのみLacZの発現が見られる。継代数1 (p1)。

図34は、シノビオリン遺伝子ヘテロ欠損マウス (13dpc胎仔) の肢芽より得られた初代培養細胞のLacZ染色およびアルシヤンブルー染色を示す写真である。LacZ陽性のコロニー (すなわちシノビオリン発現細胞) とアルシヤンブルー染色陽性のコロニーは一致している。継代数1 (p1)。

図35は、野生型マウス (13dpc胎仔) の肢芽より得られた初代培養細胞のLacZ染色およびアルシヤンブルー染色を示す写真である。LacZによる染色は観察されな

い。継代数1 (p1)。

図36は、シノビオリン遺伝子ヘテロ欠損マウス (13dpc胎仔) の肢芽より得られた初代培養細胞のLacZ染色を示す写真である。2核の典型的な軟骨細胞においても、LacZ染色 (シノビオリンの発現) が認められる (200倍の像を参照)。

図37は、マウス胎仔の肢芽より得られた初代培養細胞の von Kossa染色を示す写真である。野生型 (WT)、シノビオリン遺伝子ヘテロ (Hetero) またはホモ (Homo) 欠損マウス由来の細胞が示されている。シノビオリン遺伝子欠損マウス (Homo) において骨形成能の低下が認められる。継代数1 (p1)。

図38は、シノビオリンホモ欠損マウス胎仔の肢芽より得られた初代培養細胞 (継代数3; p3) のLacZ染色を示す写真である。サブコンフルエントになるまで培養した。LacZ染色 (overnight) を行った後、ヘマトキシリンエオシン (HE) 染色を行った。

図39は、シノビオリン遺伝子ヘテロノックアウトマウス (lacZ遺伝子ノックイン) の初代細胞の  $\beta$ -galアッセイの結果を示す図である。試料は3連で測定し、その平均と標準偏差を示した。

図40は、シノビオリン遺伝子ヘテロノックアウトマウス (lacZ遺伝子ノックイン) の初代細胞の  $\beta$ -galアッセイにより、シノビオリンプロモーター活性に対する各種薬剤の影響を調べた結果を示す図である。試料は3連で測定し、その平均と標準偏差を示した。

図41は、Syno-P3を免疫したマウス血清のELISAの結果を示す図である。3個体 (No. 1~3) から得た血清を図示した倍率で希釈してELISAを行った。非免疫マウスの血清 (図中、正常) を対照に用いた。

図42は、Syno-P2を免疫したマウス血清のELISAの結果を示す図である。3個体 (No. 1~3) から得た血清を図示した倍率で希釈してELISAを行った。非免疫マウスの血清 (図中、正常) を対照に用いた。

図43は、Syno-P1を免疫したマウス血清のELISAの結果を示す図である。3個体



(No. 1~3) から得た血清を図示した倍率で希釈してELISAを行った。非免疫マウスの血清 (図中、正常) を対照に用いた。

図4 4は、抗シノビオリンモノクローナル抗体によるRAおよびOA患者由来滑膜細胞のウェスタンブロッティング (A) および蛍光免疫染色 (B) の結果を示す写真である。

図4 5は、抗シノビオリンモノクローナル抗体によるRA患者由来滑膜組織の免疫染色の結果を示す写真である。ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色像も示した。

図4 6は、シノビオリンの自己ユビキチン化活性を示す写真である。FLAG-シノビオリンを、GST-HA-ユビキチン、ATP、E1、およびE2の存在下で反応させ、抗FLAG抗体および抗HA抗体によりシノビオリンのユビキチン化を検出した。CE: 細胞抽出液。IP: 免疫沈降物。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 〔実施例1〕 抗滑膜細胞抗血清の作製

抗滑膜細胞抗血清は、以下のような操作で調製した滑膜細胞を免疫原として用いて得た。10人の慢性関節リウマチ(RA)患者の滑膜除去手術により摘出された関節滑膜組織を、無菌的な状態でphosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。洗浄した組織を約5mm立方の大きさに細断し、37℃、20分 0.25%トリプシン/PBS消化を行った。消化された滑膜組織より余分な組織片を取り除き、得られた細胞を10%牛胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Virology, 8, 396, 1959) (10%FCS-DMEM) を用いて懸濁し、細胞培養用の滅菌シャーレ上で、5%CO<sub>2</sub>、37℃、24時間培養した。培養上清を捨て、10%FCS-DMEMを用いて洗浄し非接着細胞を取り除き、シャーレに付着した細胞としてリウマチ患者由来滑膜細胞を取得した (The Journal of Clinical Investigation, 92, 186, 1993)。培養された細胞をプールして、RA患者由来の以下の滑膜細胞として実験に用いた。

1×10<sup>5</sup> 個の患者由来滑膜細胞を、10%FCS-DMEM 20mLに懸濁して76cm<sup>2</sup> の培養フラ

スコ中で培養した。3日ごとに培地を交換し、2週間後に培養面を細胞が満たした状態になったところで培地を除き、0.05%EDTA/PBSと0.1%トリプシン/PBSを7mLずつ加えて細胞を剥がして回収した。回収した細胞をPBSで洗浄して培地成分を除去し、1mLのPBSに懸濁して免疫原とした。

この免疫原を、作成後2時間以内にウサギ（1羽）の耳に静脈注射することにより免疫した。免疫は1週間間隔で合計6回行った。6回目の免疫のときに、ウサギの耳から数mL採血して抗血清を試験したところ、蛍光抗体法によってリウマチ患者の滑膜細胞と反応することが確認できた。6回目の免疫操作の更に1週間後にカテーテルを使って心臓から可能な限りの血液を採取した。この血液を4℃で一晩放置して凝固させ血清を分離した。血清には保存剤として0.1%のアジ化ナトリウムを加え、抗滑膜細胞抗血清として4℃で保存した。

#### 〔実施例2〕 抗滑膜細胞抗血清が認識する抗原（シノビオリン）の遺伝子クローニング

実施例1で得たRA患者10名分の滑膜細胞からAcid guanidine/phenol chloroform法にてtotal RNAを抽出し、poly Tビーズを用いmRNAを精製した（Analytical Biochemistry, 162, 159, 1987）。λZAPベクター（STRATAGENE社）を用いてRA患者滑膜細胞のcDNAライブラリーを常法に従い作製した。picoBlue immunoscreening kit（STRATAGENE社）により、上記実施例1の抗滑膜細胞抗血清によるimmunoscreeningを行った（図1）。得られた陽性クローン（ファージ）をヘルパーファージによりプラスミドpBluescript II SK(+)へと変換した。pBluescript II SK(+)に挿入されたDNAの塩基配列はM13PrimerM4及びM13PrimerRV（Takara）を用いダイターミネーター法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 5463, 1977）に基づきABI PRISM 377 DNA Sequencer（PERKIN ELMER）により決定した。前述の抗滑膜細胞抗血清が認識する抗原をコードする遺伝子（「シノビオリン」と名付けた）の3'末端から塩基配列を決定し、poly(A)<sup>+</sup>鎖を含む2990bpの塩基配列を明らかにした（配列番号：1の42-3031番目）。この塩基配列を用い、滑膜細胞cDNAライブラリーか

ら5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:8998-9002, 1988) により全長シノビオリンの翻訳領域と5'-非翻訳領域の一部及びpoly(A)<sup>+</sup> 鎖を含む3031bpの塩基配列を決定した (配列番号: 1)。この塩基配列を GenBank によりホモロジーサーチした結果、類似の配列は報告されておらず新規な遺伝子であった。

#### [実施例 3] 大腸菌での部分シノビオリン組み換えタンパク質の発現

抗滑膜細胞抗血清を用いたイムノスクリーニングで得られたcDNAクローンから、シノビオリンの一部をコードするcDNA (1799bp; 配列番号: 1 の1233-3031番) を制限酵素EcoRI及びXhoI処理し抽出した。EcoRI/XhoIの認識配列を末端に持つcDNAを、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質発現ベクターpGEX-5X-3に挿入してサブクローニングした。シノビオリンcDNAの一部を挿入したpGEX-5X-3をBL21大腸菌株に42℃、45秒ヒートショックにより導入し、BL21/synoviolin-GST gene/pGEX-5X-3を得た。このBL21を0.1mg/mLアンピシリンを含むLB培地で培養し、0.1mM isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) を添加して37℃で更に2時間培養し前記融合タンパク質の発現を誘導した。遠心分離法で回収したBL21をPBSで洗浄後、1mg/mLリゾチーム消化し0.1% TritonX-100により可溶化した。可溶化されたGST融合タンパク質を含むBL21由来タンパク質懸濁液をグルタチオンセファロース4B (GS4B) に適用後PBSで洗浄し、50mM還元型グルタチオン/PBSにより目的とするGST-部分シノビオリン融合タンパク質を精製した。

#### [実施例 4] 大腸菌での全長シノビオリン組み換えタンパク質の発現

実施例 2 で得られたシノビオリンをコードするcDNA (1851bp; 配列番号: 1 の60-1910番) の3'-末端に、2分子のインフルエンザ赤血球凝集素 (hemagglutinin; HA) -tagを付加したシノビオリンcDNA (syno-HAHA) を、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質発現ベクターpGEX-5X-1に挿入してサブクローニングした。syno-HAHA遺伝子を挿入したpGEX-5X-1をBL21大腸菌株に42℃、45秒ヒートショックにより導入し、BL21/syno-HAHA/pGEX-5X-1を得た。このBL21を0.1mg/m

1アンピシリンを含むLB培地で培養し、0.1mM isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) を添加して30℃で更に3時間培養しN末端にGST、C末端にHAを融合したシノビオリン (GST-シノビオリン-HAHA) タンパク質の発現を誘導した。遠心分離法で回収したBL21をPBSで洗浄した後、1mg/mlリゾチーム消化し0.1% TritonX-100により可溶化した。可溶化したGST-シノビオリン-HAHAタンパク質を含むBL21由来タンパク質懸濁液をグルタチオンセファロース4B (GS4B) に適用後PBSで洗浄し、50mM還元型グルタチオン/Tris-HCl (pH8.0) により目的とするGST-シノビオリン-HAHAタンパク質を精製した。

発現の確認は、50mM還元型グルタチオン溶出画分をPBSで200倍、2000倍希釈し、25mM Tris-HCl (pH6.8) 、0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS) 、0.05%メルカプトエタノール、0.1%グリセロールで処理した後、8% SDS polyacrylamide電気泳動 (SDS-PAGE) に適用した。SDS-PAGE後、GST-シノビオリン-HAHAタンパク質は、エレクトロブロッティング法によりナイロン膜に転写した。このナイロン膜は、5%スキムミルクを含むPBSで室温、60分ブロッキングを行い、0.5%スキムミルクを含むPBSで400倍に希釈した抗HAモノクローナル抗体 (Boehringer mannheim社) で室温、60分免疫反応させた。反応後、0.1% Tween20/PBSで洗浄し、horse radish peroxidase (HRP) 標識マウスIgG抗体を2次抗体として室温で60分免疫反応させ、0.1% Tween20/PBSで洗浄し、HRP活性を検出することにより目的抗原を検出した。HRP活性の検出にはECLキット (Amersham社) を用いた (Clinical Chemistry. 25, p 1531, 1979) 。結果を図2に示した。上記GST-シノビオリン-HAHA融合タンパク質の分子量サイズから、シノビオリンタンパク質の分子量は約80kDaと推測された。

[実施例5] in vitroにおける全長シノビオリン組み換えタンパク質の発現

シノビオリン遺伝子 (配列番号: 1) の末端を制限酵素EcoRI修飾し、pBluescript II KSベクターに挿入した (syno/pBluescript) 。その後、syno/pBluescript (1 $\mu$ g) とTNT-coupled Translation System (Promega社) を用いin vitro translation法により、シノビオリンタンパク質を試験管内で [ $^{35}$ S] ラベル体として発現さ

せた。 [ $^{35}\text{S}$ ]ラベルしたシノビオリンタンパク質は、10% SDS-PAGEに適用しイメージアナライザー (BAS2000, Fujix) により放射活性を検出した。結果を図3に示した。シノビオリン遺伝子から試験管内で翻訳されるシノビオリンタンパク質のSDS-PAGEによる分子量は、約80kDaであることが認められた。

〔実施例6〕 ノーザンブロッティング法によるシノビオリン遺伝子の発現確認

実施例1で得られたRA患者由来の滑膜細胞、A549細胞株、Jurkat細胞株そしてHeLa細胞株より常法に従いmRNAを採取した。このmRNA 1 $\mu\text{g}$ を1%アガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロン膜にコンタクトブロッティング法で転写した。ナイロン膜を80℃、2時間処理し、デンハルト液中で42℃、2時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次いで $^{32}\text{P}$ 放射ラベルしたシノビオリンのcDNA (1799bp; 配列番号: 1の1233-3031番) をプローブとして42℃、12時間ハイブリダイズさせた。反応後のナイロン膜を300mM NaCl、30mM sodium citrateで洗浄後、15mM NaCl、1.5mM sodium citrateを使って50℃で再度洗浄を行った。目的のmRNAはX線フィルムを感光させることにより検出した。この結果得られたオートラジオグラフを図4に示した。シノビオリン遺伝子が、RA患者由来滑膜細胞に強く発現していることを認めた。

〔実施例7〕 ウェスタンブロッティング法による各種細胞におけるシノビオリンの発現確認

以下の細胞を試料として、シノビオリンの発現状態をウェスタンブロッティング法で確認した。

- ・実施例1で調製したRA患者由来の滑膜細胞
- ・ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC)
- ・HEK (human embryonic kidney) -293T
- ・実施例3で調製したGST-部分シノビオリン融合タンパク質 (陽性コントロール)

まず試料とする各種細胞から、1%NP-40で可溶化した細胞溶解液を調製した。各細胞溶解液は25mM Tris-HCl (pH6.8)、0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.05%メルカプトエタノール、0.1%グリセロールで処理し、8% SDS polyacrylamide

電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した。SDS-PAGE後各種細胞由来タンパク質は、エレクトロブロッティング法によりニトロセルロース (NC) 膜に転写した。このNC膜に対し、抗滑膜細胞抗血清を、2.0mg/mLのGST-部分シノビオリン融合タンパク質と5%スキムミルクを加えた Tris buffered saline (TBS) で1000倍に希釈して室温で60分免疫反応させた。また、陰性コントロールとして同じ抗体溶液をNC膜と反応させる実験、あるいは抗体溶液中のGST-部分シノビオリン融合タンパク質をGSTのみに代えた実験を同時に行った。反応後のNC膜を 0.1% Tween20/TBSで洗浄し、horse radish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギIgG抗体を2次抗体として室温で60分免疫反応させ、0.1% Tween20/TBSで洗浄し、HRP活性を検出することにより目的抗原を検出した。HRP活性の検出にはECLキット (Amersham社) を用いた (Clinical Chemistry, 25, p1531, 1979)。結果を図5に示した。

コントロール実験 (図5; +GST) においてRA患者由来滑膜細胞に検出され、HUVECおよびHEK-293T細胞に検出されない220kDaタンパク質に対する抗滑膜細胞抗血清の免疫反応をGST-部分シノビオリンは阻害し、約140kDaタンパク質、ならびに185kDaタンパク質に対する免疫反応も一部阻害した (図5; +GST-部分シノビオリン)。

220kDa以外のバンドで観察された反応性は、他の抗体との反応性をもとにフィブロネクチン (分子量約240kDa)、あるいはラミニンのサブユニット (分子量約200kDa) 等と推測され、この実験の結果に基づけばシノビオリンの分子量は約220kDaであることが推測された。しかしながら、実施例5で確認したシノビオリンの分子量は約80kDaである。両者の差から、シノビオリンがSDSでは解離しない多量体構造をとっている可能性が考えられた。

【実施例8】 ウエスタンブロッティング法によるRA患者由来滑膜細胞におけるシノビオリンタンパク質の発現確認

実施例1で調製したRA患者由来の滑膜細胞を 1% NP-40で可溶化した細胞破碎画分を調製した。この滑膜細胞破碎液は、25mM Tris-HCl (pH6.8)、0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.05%メルカプトエタノール、0.1%グリセロールで処理し、

8% SDS polyacrylamide電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した。SDS-PAGE後、滑膜細胞由来タンパク質は、エレクトロブロッティング法によりニトロセルロース (NC) 膜に転写した。このNC膜に対し、5%スキンミルクを加えた Tris buffered saline (TBS) で室温、1時間ブロッッキングした後、RA患者由来滑膜細胞を免疫し得られた抗滑膜細胞抗血清 (図中の免疫後) を5%スキンミルクを加えたTBSで1000倍希釈して室温、1時間免疫反応させた。同時に、ウサギに滑膜細胞を免疫する前に採取した血清 (プレイミューン) を陰性コントロールとして用いた。反応後のNC膜を 0.1% Tween20/TBSで洗浄し、horse radish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギIgG抗体を2次抗体として室温、1時間免疫反応させ、0.1% Tween20/TBSで洗浄し、HRP活性を検出することにより目的抗原を検出した。HRP活性の検出にはECLキット (Amersham社) を用いた (Clinical Chemistry. 25, p1531, 1979)。結果を図6に示した。

【実施例9】 免疫染色法による各種細胞や滑膜組織におけるシノビオリンの発現確認

免疫染色法は、滑膜細胞を常法に従いスライドガラス上に固定し、実施例1の抗滑膜細胞抗血清を用いた免疫染色を行った。1% 牛血清アルブミン (BSA) で30分ブロッッキングを行った標本に、1%BSAで100倍希釈した抗滑膜細胞抗血清を室温で60分免疫反応させた。また抗血清による観察とともに、この抗血清から精製した精製抗滑膜細胞抗体を用いた実験も行った。精製抗滑膜細胞抗体は、GST-部分シノビオリン融合タンパク質をリガンドとしてイムノアフィニティ精製することにより調製した。リガンドには、配列番号：1の1233-3031番までのシノビオリン遺伝子1799bp挿入したGST-融合タンパク質発現ベクターpGEX-5X-3をBL21に導入後発現させた融合タンパク質を用い、グルタチオンセファロースカラムをファルマシア社の方法により作製してGST-部分syno-GSカラムとした。精製抗滑膜細胞抗体を用いる場合のコントロールには、GSTをリガンドとして同じように抗血清をイムノアフィニティ精製して得た抗GST抗体を用いた。

反応後の標本をPBSで洗浄後、fluorescein isothiocyanate標識抗ウサギIgG抗体を2次抗体として免疫反応させた。抗滑膜細胞抗血清に免疫反応する抗原の確認は、共焦点レーザー顕微鏡で行った。結果を図7に示した。本抗血清はRA患者由来滑膜細胞に強く免疫反応することが認められ、この免疫反応は実施例3で作製したGST-部分シノビオリン融合タンパク質によって阻害されることが確認できた（図7上段）。更にこの抗血清から精製した精製抗滑膜細胞抗体では、免疫反応が更に強まり強陽性となることも確認できた（図7下）。

RA患者由来滑膜組織の染色は、常法に従い滑膜組織をスライドガラス上に固定して行った。1% BSAで30分ブロッキングした標本に対して、1% BSAで100倍希釈した抗滑膜細胞抗血清を室温で60分間免疫反応させた。反応後の標本をPBSで洗浄し、HRP標識抗ウサギIgG抗体を2次抗体として免疫反応させた。抗滑膜細胞抗血清に免疫反応する抗原は、HRP活性に基づく3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩の発色により確認した。前述のウェスタンブロッティング法と同様にして、GST-部分シノビオリン融合タンパク質を用いた抗滑膜細胞抗血清吸収試験を滑膜組織染色に対して行った。GST-部分シノビオリン融合タンパク質を2.0mg/mLあるいはGST（2.0mg/mL）を抗滑膜細胞抗血清に加え組織染色を行った。結果は図8に示した。コントロールで認められた抗滑膜細胞抗血清の滑膜組織に対する染色性は、GST-部分シノビオリン融合タンパク質により弱められることが認められた（図8）。加えて上記GST-部分Syno-GSからの精製抗体を使った滑膜組織に対する免疫染色は、GST-GSから得られた抗体と比較し、強陽性に反応することが認められた（図9）。

ウェスタンブロッティング法（実施例8）および免疫染色法の結果より、抗滑膜細胞抗血清が認識するシノビオリンタンパク質はRA患者由来滑膜細胞及び滑膜組織に発現していることが確認された。

#### [実施例10] RA患者血清中抗シノビオリン抗体の存在

GST-部分シノビオリン融合タンパク質を抗原として、ウェスタンブロッティング法によってRA患者血清中の抗シノビオリン抗体の検出を試みた。実施例7と同様の



操作により、まずGST-部分シノビオリン融合タンパク質 (100ng/lane) をSDS-PAGEにより泳動し、NC膜に転写した。1次抗体としてRA患者血清 (5例) を Tris buffered saline (TBS) で1000倍希釈し、GST-部分シノビオリン融合タンパク質を転写したNC膜に対して室温で60分免疫反応させた。0.1% Tween20/TBSでNC膜を洗浄した後HRP標識抗ヒトIgG抗体を2次抗体として室温で60分免疫反応させ、0.1% Tween20/TBSで洗浄し、HRP活性を検出することにより目的抗原と反応したヒトIgGを検出した。HRP活性の検出は実施例7と同様に行った。結果を図10に示した。RA患者の血清中 (5例中5例) にはGST-部分シノビオリン融合タンパク質に対する抗IgG抗体が存在することが認められた (図10)。一方、変形性関節症 (OA) 患者由来血清及び正常ヒト血清中にはGST-部分シノビオリンを認識する抗体は認められなかった。

〔実施例11〕 発現ライブラリーのスクリーニングによるシノビオリンリガンドの同定

実施例2で作製したRA患者滑膜細胞由来のcDNA発現ライブラリーを用いて、シノビオリンリガンドのスクリーニングを行った (竹縄忠臣、渡邊俊樹編、バイオマニュアルUPシリーズ “タンパク質の分子間相互作用実験法”、pp. 66-67、羊土社; Kaelin, W. G. et al., Cell 70, 351-364, 1992; Skolnik, E. Y. et al., Cell 65, 83-90, 1991; Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, a laboratory manual second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 12.16-12.20, 1989)。ライブラリーファージを大腸菌 (XL1-Blue MRF') に37℃20分間インキュベートして感染させ、Topアガロースと混和後プレートに広げた。42℃で3.5時間培養後、10mM IPTG に浸漬した後乾燥させたニトロセルロースメンブレンをプレートに載せ、さらに37℃で3.5時間培養を行った。メンブレンを回収後、洗浄バッファー [10mM Tris-HCl (pH8.0), 0.5% Skim milk, 0.1% TritonX-100, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, protease inhibitor (complete, Boehringer Mannheim 社)] で5分間の洗浄を5回行った後、ブロッキングバッファー [10mM Tris-HCl (p

H8.0), 5% Skim milk, 0.1% Triton X-100, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 5% glycerol, protease inhibitor (complete, Boehringer Mannheim 社) ] に1時間浸漬した。洗浄バッファーで5分間の洗浄を5回行った後、プロテインキナーゼAで <sup>32</sup>Pラベルした GST-シノビオリン(実施例3で精製した GST-部分シノビオリン融合タンパク質) をプローブとして加え (約10<sup>6</sup> cpm/ml) 、インキュベートした。メンブレン1枚のカウントが約1kcpmになるまで洗浄バッファーを変えながら洗浄を繰り返し、オートラジオグラフィーによりシグナルを検出した。その結果、シノビオリンに結合するクローンが得られた。このクローンをシノビオリンリガンド (SL) と名付けた。

SLのcDNAについて、その5'末端付近の100bp、ならびに3'末端付近の100bpについて塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報を基にデータベースの検索を行ったところ、末端部分の100bpにおいてはS1-5 [Lecka-Czernik, B. et al., Molecular and Cellular Biology, 15, 120-128, 1995; accession number U03877 (cDNA), AAA65590 (protein)、"EFEMP1" とも呼ばれる: Stone, E. M. et al., Nature Genetics 22, 199-202, 1999; accession number Q12805 (protein)] と呼ばれる公知の遺伝子と共通の配列であることが明らかとなった。両者の遺伝子とその翻訳産物の大きさはほぼ同じであり、同一のタンパク質であることが示唆された。

#### [実施例12] ノーザンブロッティング法によるSL遺伝子の発現

実施例6と同様に各種細胞よりmRNAを採取し、実施例11で得られたSLのcDNAをプローブとしてノーザンブロッティング法を行った。用いた細胞は以下のとおりである。RA患者由来滑膜細胞は、SL遺伝子を強発現していることが認められた (図11)。

HEK-293T

実施例1で調製したRA患者由来の滑膜細胞

A549

HeLa

## [実施例 13] シノビオリンとSLの結合

SL cDNAを実施例 3 と同様にpGEXベクターに挿入し、GST-SL融合タンパク質を作製し、10% SDS-PAGEにGST-SL (500ng)、コントロールとしてGST (1 $\mu$ g) を適用した。SDS-PAGE後、エレクトロブロッティング法によりナイロン膜に転写した。このナイロン膜を、6M guanidine hydrochloride、5mM 2-Mercaptoethanolを含む50mM Tris-HCl (pH8.0) で1時間、室温で変性させ、5mM 2-Mercaptoethanol、0.05% Tween20を含む50mM Tris-HCl (pH8.0) で4℃、一晚再生した。再生されたナイロン膜は、Blocking buffer [10mM Tris-HCl (pH8.0), 5% Skim milk, 0.1% Triton X-100, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 5% glycerol, protease inhibitor (complete, Boehringer Mannheim社)] で処理し、Blocking buffer (0.5% skim milk以外は上記と同じ組成) で洗浄した。その後、TNT-coupled Translation System (Promega社) 及びpcDNA3-HA-シノビオリン-HAHA (配列番号: 1のシノビオリンcDNA 1851bp;60-1910にHA-tagを付加したシノビオリンcDNAを発現ベクターpcDNA3に挿入した) を用い、in vitro translationを行い [<sup>35</sup>S]ラベルしたHA-シノビオリン-HAHA融合タンパク質 ([<sup>35</sup>S]HA-シノビオリン-HAHA) をプローブとして用いナイロン膜上のGST-SL及びGSTと室温で2時間反応させた。そのナイロン膜は、10mM Tris-HCl (pH8.0), 0.5% Skim milk, 0.1% TritonX-100, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, protease inhibitor (complete, Boehringer Mannheim社) で洗浄し、イメージアナライザー (BAS2000, Fujix) で放射活性を検出した。ナイロン膜に転写されたGST-SL融合タンパク質と [<sup>35</sup>S]HA-シノビオリン-HAHAは、両者の結合が観察された。またコントロールであるGSTと [<sup>35</sup>S]HA-シノビオリン-HAHAとの結合は認められなかった (図12)。この結果から、シノビオリンとSLは、タンパク質の相互作用により結合することが推測された。

また実施例 14 では、シノビオリンによる培養物中のシノビオリンリガンドの中和を通じて滑膜細胞の増殖が阻害されることを示唆する結果が得られている。これらの結果に基づいて、SLのシノビオリン結合部位に相当する構造を持ったSLの変異

体は、シノビオリン-SL間の結合に対する拮抗阻害作用によって滑膜細胞の増殖を抑制する作用を持つ可能性が考えられる。更に、シノビオリンのSL結合部位に相当する構造を持ったシノビオリン変異体についても、SL変異体と同様の拮抗阻害作用を期待できる可能性が有る。

#### 〔実施例 1 4〕 MTTアッセイ

実施例 1 で調製したRA患者由来滑膜細胞を $5 \times 10^3$  cell/wellとなるように 96 well plateを用い調製し、GSTまたはGST-部分シノビオリンを最終濃度 $0.01 \sim 1 \mu\text{M}$ となるように細胞上清に添加した。培養 3 日後 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)/PBSを細胞上清に添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件で 3 時間培養を行った。培養後細胞上清を取り除きdimethyl sulfoxideによりMTT formazanの結晶を溶解し吸光度測定を行った (Journal of Immunological Methods, 65, 55, 1983)。10%-FCS/DMEM、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件下でのRA患者由来滑膜細胞増殖はGST-部分シノビオリン ( $1 \mu\text{M}$ ) によって有意に抑制された (図 1 3)。

#### 〔実施例 1 5〕 シノビオリン遺伝子導入マウスの作製

シノビオリン蛋白質をコードするDNAのN末にFlagタグを連結させ、3' 側下流にポリA シグナルを結合させたシノビオリン遺伝子導入用ベクターを構築した。ベクターはpCAGGS (Niwa, H. et al., Gene 108: 193-9, 1991) を基にして構築し、プロモーターには、 $\beta$  アクチンプロモーター、エンハンサーには、ヒトサイトメガロウイルス前期エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early enhancer) を用いた (図 1 4)。

シノビオリン遺伝子導入用ベクターは、顕微鏡下でマニピュレーターに接続した微小ガラスピペットを用いマイクロインジェクション法によりマウスの卵細胞に導入した。受精卵の雄性前核にDNAを注入し、注入した操作卵は、精管結紮雄マウスとの交配により偽妊娠を誘起した雌マウス (レシピエントマウス) の卵管内に移植した。移植19日後に自然分娩または帝王切開により仔マウスを得た。帝王切開の

場合は、別に準備しておいた雌マウスを里親として仔マウスを哺育させた。各出産仔の尾からDNAを採取し、PCR法を用いて導入遺伝子が保持されていることを確認した。

その結果、シノビオリン強発現マウスには顕著な関節の腫脹が認められた。シノビオリン遺伝子導入マウスにおける関節症発症率は33% (10匹/30匹) であったことから、関節の腫脹は自然発症的なマウスの奇形 (C57B6マウスの水頭症発症率は1%未満) ではなく、シノビオリン分子の関与によるものと考えられる。シノビオリン強発現マウスの左後肢を軟X線撮影した写真を示す (図15)。

#### [実施例16] 関節の組織学的検討

シノビオリン遺伝子導入マウス (1匹) の指関節の組織学的な検討を行った。指関節部分の組織切片をヘマトキシリンエオジン (HE) 染色した。ヘマトキシリンエオジン染色は、公知の方法により実施した。

HE染色の結果、関節症を呈した部分においては著しい滑膜増生に伴う骨破壊と異常な骨新生が認められた (図16)。一方、対照とした遺伝子導入マウスの正常な指関節においては、上記所見は観察されなかった (図17上)。

また、指関節における抗Flag抗体による免疫染色を行った結果、シノビオリン遺伝子導入マウスにおいては、増生を示した滑膜組織および軟骨細胞にシノビオリンの発現が認められた (図18) が、遺伝子導入マウスの正常な指関節においては上記所見は観察されなかった (図17下)。

#### [実施例17] ノックアウトマウスの作成

マウスシノビオリン遺伝子断片の翻訳開始点 (第一メチオニンを翻訳するATGコドン) にlacZ遺伝子を導入し、ターゲティングベクターを構築した。マーカー遺伝子としてネオマイシン耐性 (neo) 遺伝子を導入し、またジフテリア毒素A (DT-A) 遺伝子も結合させ非相同的な組換えを起こした細胞株を排除できるようにした (図19)。

このターゲティングベクターをマウスのES細胞 TT-2 にエレクトロポレーション

ンにより導入し相同組み換えを生じた細胞株を選抜した。得られた細胞をマウスの胚胎盤胞または8細胞期胚に注入し直接仮親の卵管に移植するか、一日培養して胚盤胞まで発生したものを仮親の子宮に移植した。その後は、トランスジェニック動物の作製と同様の手法により、ノックアウトマウスを作製した。得られたヘテロ変異マウス (F1) 同士を交配させ、ヘテロ及びホモ変異マウスを得た。こうして得られた変異マウスにおいては、本来シノビオリンが発現すべき組織で、シノビオリンに代わってLacZタンパク質 ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ) が発現する。

遺伝子型はサザンブロット解析により確認した。野生型マウス (14匹) およびシノビオリンヘテロノックアウトマウス (32匹) に関しては、生後2週齢ほどのマウスの尾先端3mm程度からDNAを抽出した。シノビオリンホモノックアウトマウスでは、胎生14.5日の胎仔から実体顕微鏡下に尾部および上、下肢の一部を採取し、DNAを抽出した。得られたDNAを制限酵素PstIでDNAを消化したものを用いた。解析結果を図20に示す。野生型では6.5kbp、ホモ変異マウスでは8.5kbp、ヘテロ変異マウスでは両方の位置にバンドが検出された。

シノビオリン遺伝子の発現をノーザンブロッティングにより確認した。野生型、ヘテロノックアウトマウス、およびホモノックアウトマウス (胎生12.5日の胚全体) からmRNAを抽出し、1.2%アガロースゲルの各レーンに20  $\mu$ gずつ電気泳動した。その結果、ホモノックアウトマウス (-/-) ではシノビオリンmRNAは検出されず、ヘテロノックアウトマウス (+/-) では、野生型 (+/+) に比べ弱いmRNAの発現が見られた (図21)。

#### [実施例18] シノビオリン発現部位の検討

実施例17で得た変異マウスにおけるシノビオリン発現部位をLacZ染色により検討した。すなわち、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-Gal) を用いて胚全体を発色させ、LacZ ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性として) の発現分布を調べた。観察した胚の数は、32個である。

その結果、胎生12.5日齢では、頭頂骨および四肢に、13.5日齢では耳および四肢

にLacZの強い発現が認められた(図22)。いずれも骨および軟骨が形成される部位であった。更に四肢形成期における四肢組織切片のLacZ染色およびHE染色を行った結果、Apical Ectodermal Ridge (AER; 外胚葉頂堤) および軟骨・骨原基(または軟骨・骨)に強い発現が観察された(図23)。

さらに、胎生13日齢の肢芽(limb bud)を取りだし、凍結切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色またLacZ染色を行った。具体的には、凍結切片をPBS(-)で5分、3回洗浄し、X-gal染色液[X-gal (20mg/ml) 1.25ml, HEPES (1M) 2.2ml, フェリシアン化カリウム溶液(100mM) 1.5ml, NaCl (5M) 150 $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (1M) 65 $\mu$ l, 10 $\times$ PBS(-) 5ml をミリQ水(ミリポア)で50mlとしたもの]に切片をのせたスライドグラスを浸し、37 $^{\circ}$ Cで反応を開始させた。染色後、エタノールシリーズおよびキシレンで脱水し、封入した。その結果、LacZの青色の染色が、未分化間葉系の細胞(骨・軟骨の原基)に濃染されていた(図24および25)。

#### [実施例19] 表現型の検討

更にシノビオリン遺伝子ノックアウトマウスの表現型について検討を行った。

胎生12.5日齢では、ホモはヘテロと比較し、頭頂部から臀部までの長さが短く、頭蓋や四肢の形成が未熟である傾向が認められたが、胎生13日齢ではヘテロと野生型の表現型の間に顕著な差は認められなかった(図26)。なお、ホモマウスでは出生が認められず、さらに少なくとも胎生17日以降のホモの胎仔の生存が確認できなかったことにより、胎生致死と考えられた(表1)。

表1

日齢/週齢	解析数	野生型	ヘテロ型	ホモ型(生死)
胎生 12.5 日	10	0	8	2(生)
胎生 13 日	10	2	7	1(生)
胎生 14.5 日	6	2	3	1(?)
胎生 15.5 日	6	0	5	1(死)
生後 4 週齢	46	14	32	0

胎生14.5日齢では、ヘテロとホモの間において、頭頂部から臀部までの長さに顕著な差は認められなかった。しかし、ヘテロでは指及び関節が形成されているのに

対し、ホモでは形成されず、肢芽異常が認められた（図27）。

更に、ホモで異常を示した後肢に対しLacZおよびHE染色を行った結果、AER及び未分化間葉系細胞の濃縮部位（将来指骨を形成する部位）にシノビオリンの発現を反映するLacZの発現が認められた（図28）。

胎生15.5日齢では、ホモは肢芽、上下顎骨および耳に形態異常を示し、死亡していた（図29）。更にアルシヤンブルーにより軟骨組織、アリザリンレッドにより骨（石灰化）組織の染色を行った。すなわち、マウスの表皮・真皮・内容物を取り除き、固定液（エタノール：過酸化水素水＝9：1）に漬け、その後アルコールシリーズで脱水後、アリザリンレッドおよびアルシヤンブルーにより染色し、アルカリ溶液により組織を透明化した。透明化終了後、グリセリン溶液中に保存し染色を観察した。結果、ホモでは軟骨組織（青く染色）、及び骨（石灰化）組織（赤く染色）のいずれも形成が認められなかった（図30）。

以上の結果より、シノビオリン遺伝子ホモノックアウトマウスは、胎生期において肢芽の発生異常が認められ、また、軟骨及び骨への形成が認められず、肢芽と軟骨、骨の発生部位にシノビオリンの発現が認められたことから、シノビオリン分子の骨格形成への関与が強く考えられた。

【実施例20】 シノビオリン遺伝子ノックアウトマウスにおける関節炎用カクテル投与

マウスにおけるコラーゲン誘導関節炎（CIA）は、ヒト慢性関節リウマチの関節炎モデルとして広く利用されている。実施例17で作製したシノビオリン遺伝子ノックアウトマウス（ヘテロ接合体）または野生型マウスに抗コラーゲン抗体カクテルを投与し、惹起される関節炎を観察した。その結果、シノビオリンのヘテロノックアウトマウスでは、野生型に比べ関節炎の惹起が弱いことが判明した（図31）。この結果からも、シノビオリンがRAにおける関節炎誘発に貢献していることが支持される。

【実施例21】 シノビオリン遺伝子ノックアウトマウスの胎仔肢芽細胞の初代培



## 養の解析

ノックアウト (KO) マウスより得られた (explant法) 細胞のうち、軟骨・骨および肢の原基となると考えられる未分化間葉系細胞にのみLacZ染色、すなわちシノビオリンの発現が認められた。また、胎仔肢芽細胞の初代培養において、LacZ陽性のコロニー (すなわちシノビオリン発現細胞) とアルシヤンブルー染色陽性のコロニーは一致しており、さらに双核の典型的な軟骨細胞においてもLacZ ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性として) の染色 (シノビオリンの発現) が見られることから、骨・軟骨分化にシノビオリンが関与していることが支持された。さらにアルカリフォスファターゼ染色、Kossaの染色などにより、骨・軟骨形成能がホモノックアウト由来の細胞では遅延していることが確認された (図32~38)。

Kossa染色は、細胞を洗浄後、硝酸銀溶液 (5% w/v) で置換し、蒸留水で軽く洗浄後、チオ硫酸ナトリウム溶液 (5% w/v) で還元・定着を行い、洗浄後、ケルンエヒトロート液 (0.1% w/v ケルンエヒトロート (ヌクレア・ファストレッド), 5% w/v 硫酸アルミニウム) で対比染色を行った (関 正次, 「組織検査法—組織構造と局所化学—」, 257-258, 杏林書院, 1961; リゾン, L., 今泉 正訳, 「組織化学および細胞化学—理論と方法」, 625-636, 白水社, 1962; 佐野 豊, 「組織化学研究法—理論と術式」, 616-621, 南山堂, 1965)。アルカリフォスファターゼ活性の検出は、アルカリフォスファターゼ組織染色キット (Sigma, Diagnostic Kits and reagents, alkaline phosphatase (AP), leukocyte, Cat. No. 86-R) により行った。

[実施例22] シノビオリン遺伝子ノックアウトマウス由来の細胞を用いた被験化合物のアッセイ

シノビオリン遺伝子ヘテロノックアウトマウス (lacZ遺伝子ノックイン) の初代培養細胞を用いて、被験試料がシノビオリン遺伝子の発現に及ぼす効果を $\beta$ -galアッセイにより評価した。3回継代したシノビオリン遺伝子ヘテロノックアウトマウスの初代培養細胞を24ウェルプレートに1ウェル当たり  $0$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $1 \times 1$

$0^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、および  $1 \times 10^5$  細胞播き、10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で一晚培養した。まず、無刺激条件のまま細胞培養に細胞溶解液 (プロメガ社製) を細胞層が完全に覆われるのに十分な量 ( $100 \mu\text{l}/\text{well}$ ) 加え、培養プレートを手振とう機に移し、細胞層が溶解液に常に浸されるように室温で15分ゆっくりと振とうした。

細胞の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、次のようにして測定した。得られた細胞抽出液  $20 \mu\text{l}$  に、Mg溶液 ( $0.1\text{M MgCl}_2$ ,  $4.5\text{M } \beta$ -メルカプトエタノール) を  $1 \mu\text{l}$ 、ONPG溶液 (*o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) ( $0.1\text{M}$  リン酸緩衝液 (pH7.5) 中に  $4\text{mg/ml}$  の濃度) を  $22 \mu\text{l}$ 、および  $0.1\text{M}$  リン酸緩衝液 (pH7.5)  $57 \mu\text{l}$  を加え、全量を  $100 \mu\text{l}$  とした。乾燥しないように注意して、 $37^\circ\text{C}$  で6時間インキュベートした。 $150 \mu\text{l}$  の  $1\text{M}$  炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $21.2\text{g}$  を  $\text{H}_2\text{O}$  に溶かして  $200\text{ml}$  にメスアップし、 $0.45 \mu\text{m}$  フィルターで濾過したもの) を加えて反応を停止させ、 $420\text{nm}$  の吸光度を測定して  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を定量した。実験は3連で行った。その結果、*lacZ* 遺伝子ノックインマウス細胞において細胞数に依存した  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が検出された (図39)。  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標としてプロモーター活性を評価 ( $\beta$ -galアッセイ) できることが確認された。

次に初代培養細胞に各種薬剤を添加して同様の  $\beta$ -galアッセイを行い、シノビオリンプロモーター活性に対する各種薬剤の影響を評価した。陰性対照として、培地のみを添加して同様の測定を行った。被験薬剤としては、プレドニソロン (Prednisolone) ( $0.01$ – $1 \mu\text{M}$ )、および12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA;  $0.001$ – $0.1 \mu\text{M}$ ) を用いた。プレドニソロンはステロイド性抗炎症剤、TPAはプロテインキナーゼCの活性化剤である。

ウェル当たり  $5 \times 10^4$  の初代培養細胞を撒き、一晚培養後に上記濃度の各薬剤を添加した。薬剤添加後に72時間培養して、各ウェルの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定しプロモーター活性を評価した。その結果、これらの薬剤により、濃度依存的にシノビオリンプロモーター活性が影響を受けることが判明した (図40)。す

なわち、本発明に基づくアッセイ系によって、薬剤のシノビオリンプロモーターに与える活性を評価しうることが裏付けられた。以上の結果から、このようなアッセイにより、各種の薬剤がシノビオリンプロモーター活性に及ぼす効果を評価することが可能となり、シノビオリンプロモーター活性を促進または抑制する化合物をスクリーニングすることができる。

### [実施例 2 3] 抗シノビオリンモノクローナル抗体の作製

シノビオリンに対するモノクローナル抗体を以下のように調製した。免疫用のペプチドとして、以下に示すヒトシノビオリンの部分アミノ酸配列を含む 3 種類のペプチドを合成した。これらのアミノ酸配列は、抗原性を有すると推測された領域から選択した。

Syno-P3 (SLALTGAVVAHAYYC/配列番号：3)、

Syno-P2 (TCRMDVLRASLPAQS/配列番号：4)、および

Syno-P1 (GAATTTAAGTSATAC/配列番号：5)

各合成ペプチドに、アミノ酸配列中のCysを介して、スカシガイヘモシアニン (KLH) を結合させた。KLHを結合した各合成ペプチドの 50  $\mu$ g を 0.1ml 生理食塩水に溶解し、フロイントの完全アジュバント (FCA) 0.1ml を加えて免疫原を作製した。各免疫原をそれぞれ 8 匹のマウス (BALB/Cメス、5週齢) 背部皮下に 0.2ml 注射し免疫した。免疫は2週間毎に計4回行い、その1週間後にさらに1回免疫した。最終免疫の8日後に、心臓から採血し血清 200  $\mu$ l 以上を分取した。ELISAによって抗体価の上昇を確認できた個体から脾細胞を採取し、細胞融合を行った。

各免疫原につき 3 個体のマウス血清について、ELISAによる抗体価の測定結果を図 4 1～図 4 3 に示した。各血清試料は 3 連でアッセイを行い、その平均値をグラフに示した。いずれの免疫原を用いた場合にも、抗体価が上昇した個体が確認された。これらの免疫原がいずれもシノビオリンの免疫原として有用であることが確認された。

ミエローマ細胞株 (P3U1) とマウス脾細胞を 1:10 で混和し、50%のPEG (和光

純薬社PEG1540) 存在下で細胞融合させた。融合後、脾細胞数が  $5 \times 10^5$  個/ml となるように96ウェルプレートに播いた。HAT培地中で10~14日培養した後、細胞の増殖を確認し、培養上清の検定した。培養上清の検定には、各合成ペプチドを固相化したELISAプレートを用いた。検定の操作は次のとおりである。ELISAプレートに培養上清を反応させた後、抗マウスIgGヤギ-poxを用いて陽性ウェルを選択した。クローニングに供するウェルを選択し、他の陽性ウェルの細胞については凍結保存した。

数日後、一株につき96ウェルプレート1枚、100細胞/プレート(20細胞/ml) となるように撒き、10~14日間培養した。コロニーを判定し、培養上清の検定を行った。培養上清の検定は、上清50  $\mu$ lを上記スクリーニング用抗原固相化ELISAプレートに適用して行った。第二抗体は、抗マウスIgGヤギ-poxを使用した。選択したコロニーは、培養後、リクローニングし、10~14日間培養してコロニー判定および培養上清の検定を上記と同様に実施した。親株別にウェルを選択し、24ウェルプレートで培養し、上清を回収してクローンのチェックを行い、抗体のサブクラスおよび抗体産生を検定した。クローニングの結果、シノビオリンに対する高い親和性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして、Syno-P2(配列番号: 4)を免疫原として得られた2つのクローン10Dbおよび7Bcが選択された。

#### [実施例24] 抗シノビオリンモノクローナル抗体を用いた患者試料のシノビオリンの検出

##### (1) 抗シノビオリンモノクローナル抗体による患者由来滑膜細胞のウェスタンブロットティング

実施例23で得られたSyno-P2を認識する2種の抗シノビオリンモノクローナル抗体(10Dbおよび7Bc)を用いて、慢性関節リウマチ患者(RA)由来滑膜細胞の蛋白質をSDS-PAGEで分離し、ウェスタンブロットティング法を行った。ウェスタンブロットティング法の操作は、抗体として実施例23のモノクローナル抗体10Dbおよび7

Bcを、そして標識抗体として抗マウスIgGヒツジ-HRPを用いる他は実施例8に記載のとおりである。対照として、変形性関節症患者(OA)由来の滑膜細胞も解析した。その結果、RA患者由来の滑膜細胞で特異的なシグナルが検出された(図4 4A)。実施例2 3で得られたモノクローナル抗体は、RA患者の滑膜細胞を特異的に認識することが確認された。これらのモノクローナル抗体は、RAの検出に有用である。

#### (2) 抗シノビオリンモノクローナル抗体によるRA患者由来滑膜細胞の蛍光免疫染色

モノクローナル抗体10Dbを用いて、RA患者由来滑膜細胞の蛍光免疫細胞化学解析を行った。免疫染色の操作は、抗体として実施例2 3のモノクローナル抗体10Dbを、そして標識抗体として抗マウスIgGヒツジ-FITCを用いる他は実施例9に記載のとおりである。シノビオリン蛋白質のシグナルは、RA患者由来滑膜細胞で強く検出されたが、二次抗体のみを反応させた対照では検出されなかった(図4 4B)。

#### (3) 抗シノビオリンモノクローナル抗体によるRA患者由来滑膜組織の免疫染色

モノクローナル抗体10Dbおよび7Bcを用いて、RA患者から採取した滑膜組織切片の免疫染色を行った。免疫染色の操作は、抗体として実施例2 3のモノクローナル抗体10Dbおよび7Bcを、そして標識抗体として抗マウスIgGヒツジ-HRPを用いる他は実施例9に記載のとおりである。シノビオリン蛋白質のシグナルは、RA患者由来滑膜組織で強く検出された(図4 5)。同時に行ったHE染色により、滑膜細胞の増殖層が観察され、その部分がモノクローナル抗体で染色されていることが確認された。これらの結果から、本発明のモノクローナル抗体は、RA患者の滑膜組織を特異的に認識することが確認された。以上のように、シノビオリン抗体を用いて患者試料中のシノビオリンを検出することにより、RAの検査および診断を実施することができる。

#### [実施例2 5] シノビオリンのユビキチンリガーゼ活性の検出

E3ユビキチン-蛋白質リガーゼは、自己ユビキチン化をすることが知られている

(Hashizume R et al., J. Biol. Chem. 276, 14537-14540, 2001)。そこで、シノビオリンについて自己ユビキチン化活性があるかどうか検討した。pCAGGSベクターにFLAG-シノビオリン遺伝子を挿入したプラスミドを、HEK-293細胞にトランスフェクションし、36時間後細胞を回収した。Buffer A [15 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.35% NP-40, 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 2  $\mu$ g/ml leupeptin] にて細胞破碎液を得た。細胞破碎液を高速遠心器にて遠心分離し、その上清0.6 mlに、3  $\mu$ gの抗FLAG抗体および7.5  $\mu$ lのプロテインAビーズを添加し、一晚免疫沈降を行った。Buffer Aもしくは0.1% SDS を添加した Buffer Aにて3回、Buffer B [25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.01% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM EDTA] にて2回ビーズを洗浄し、30  $\mu$ lのユビキチンリガーゼ反応液 [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaF, 10 mM okadaic acid, 2 mM ATP, 0.6 mM DTT, 1.5  $\mu$ g GST-HA-ユビキチン, 40 ng 酵母由来E1, 0.3  $\mu$ g UbcH5c(E2)] を添加し、37°Cで30分反応させた。0.1 M DTTを含む 2×Laemmli SDS-loading bufferを30  $\mu$ l 加え、ボイルした後、SDS-PAGEにて展開し、ニトロセルロース膜にトランスファーした。一次抗体には抗FLAG抗体 (SIGMA) および抗HA抗体 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を用いた。HRP活性の検出は実施例7と同様に行った。なお、コントロールとして FLAG-シノビオリン遺伝子をトランスフェクションした細胞の破碎液のみ (免疫沈降前)、または、細胞破碎液を免疫沈降操作して得た溶液 (すなわちFLAG-シノビオリタンパク質とその免疫複合体のみ) を用いた。さらに、GST-HA-ユビキチン、ATP、E1またはE2のいずれかを添加しない反応も行った (GST-HA-ユビキチン非添加の場合はGSTを用いて反応を行った)。0.1% SDS添加Buffer A 洗浄によりimmunopurificationしたシノビオリンを用いた結果を図46に示した。抗HA抗体によるプロットにおいて、シノビオリンの分子量 (図46 \*印) より約35 kDa大きなサイズのバンドが検出された (図46 矢印)。このバンドは抗FLAG抗体によるプロットにも見られ、GST-HA-ユビキチンがシノビオリンに付加したものと考えられた。さらに、ATP、E1またはE2のいずれかを欠損した反応系では、シノ

ピオリンの自己ユビキチン化が起こらないことが示された。Buffer Aのみでビーズを洗浄した場合にも同様の結果となった。これらの結果より、1) シノピオリンを含む免疫複合体にE1およびE2依存的なユビキチンリガーゼ活性が存在し、かつ、immunopurificationの結果より、2) シノピオリンはE3ユビキチン-蛋白質リガーゼ活性を有することが明らかとなった。

### 産業上の利用の可能性

本発明は、滑膜の発達、ならびに骨・軟骨および四肢の発達に関与する新規な蛋白質をコードする遺伝子「シノピオリン」を提供した。本発明の遺伝子はRAに関与しており、RA患者では、この遺伝子産物に対する抗体が産生されている。本発明の遺伝子およびタンパク質は、RAの診断に有用な新規なマーカーとなる。本発明の「シノピオリン」は、RA患者の関節滑膜細胞に強発現しており、インサイチュハイブリダイゼーションやインサイチュPCRにより、RA疾患の診断や治療効果の判定に貢献する。更に、RA患者の血中にはシノピオリンに対する抗体を高頻度で見出すことができる。これをマーカーとすることでRAの特異的な診断を可能とする。本発明によって提供されるシノピオリン蛋白質、またはその部分ペプチドは患者血清中のシノピオリンに対する抗体の検出に有用である。

また、シノピオリンは未分化間葉系細胞において発現している。シノピオリンを細胞マーカーとして利用すれば、胚の細胞などから未分化間葉系細胞を回収することができる。未分化間葉系細胞は骨、軟骨に分化する細胞であり、再生医学的応用が期待されている。すなわち、シノピオリンを細胞マーカーとして回収した未分化間葉系細胞を試験管内または生体内で分化させ、骨・軟骨の形成や関節の再構築を行えば、傷害を受けた骨・軟骨組織や関節を新たに再生させることも可能になる。

本発明のシノピオリン、並びにそのリガンドは、RAの主要な病態である関節滑膜細胞の増殖に密接に関連していることが明らかにされた。したがって、本発明によって提供されるシノピオリン、あるいはそのリガンドは、RAの治療方法の開発に当

たって重要な知見を与える。より具体的には、シノビオリンとそのリガンドとの結合に関与する化合物をスクリーニングすることにより、これまでとはまったく異なったアプローチでRA治療技術の開発を進めることができるのである。さらにシノビオリンのトランスジェニックマウスは、高い頻度で関節の滑膜が増生し、関節炎を伴う指関節の膨脹を起した。本発明により提供されるシノビオリンのトランスジェニック動物は、RAのモデルとして、その治療技術や医薬品の開発に極めて有用である。



## 請求の範囲

1. 下記 (a) から (e) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
  - (a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド、
  - (b) 配列番号：1 に記載の塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド、
  - (c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
  - (d) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド
  - (e) 配列番号：1 に記載の塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有する塩基配列からなり、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド
2. 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。
3. 請求項1、または請求項2 に記載のポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質またはペプチド。
4. 次の(1) - (3) からなる群から選択される少なくとも1つの活性を有する請求項3 に記載の蛋白質またはペプチド。
  - (1) 慢性関節リウマチ患者の血液中找到される抗体と結合する
  - (2) シノビオリンリガンドS1-5と結合する
  - (3) 滑膜増生を促進する

5. 請求項 1、または請求項 2 に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター。
6. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 5 に記載のベクターを保持する形質転換細胞。
7. 請求項 6 に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、請求項 3 に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。
8. 請求項 3 に記載の蛋白質またはペプチドに結合する抗体。
9. 請求項 3 に記載のタンパク質またはペプチドを含む、請求項 3 に記載のタンパク質またはペプチドを認識する抗体を分析するための免疫学的分析用試薬。
10. 慢性関節リウマチの診断、または治療効果の判定を目的とするものである請求項 9 の免疫学的分析用試薬。
11. 請求項 3 に記載のタンパク質またはペプチドと反応する抗体を含む、請求項 3 に記載のタンパク質を分析するための免疫学的分析用試薬。
12. 慢性関節リウマチの診断、または治療効果の判定を目的とするものである請求項 11 に記載の免疫学的分析用試薬。
13. 分析すべき請求項 3 に記載のタンパク質が滑膜細胞に存在するものである請求項 12 の免疫学的分析用試薬。
14. 次の工程を含む、生体試料中の請求項 3 に記載の蛋白質、および／またはその部分ペプチドに結合する抗体の測定方法。
  - (1) 生体試料を請求項 3 に記載の蛋白質、および／またはその部分ペプチドと接触させる工程、および
  - (2) 請求項 3 に記載の蛋白質、および／またはその部分ペプチドに結合する抗体を検出する工程
15. 次の工程を含む、生体試料中の請求項 3 に記載の蛋白質、および／またはその部分ペプチドの測定方法。
  - (1) 生体試料を請求項 8 に記載の抗体と接触させる工程、および

(2) 請求項 3 に記載の蛋白質、および／またはその部分ペプチドに結合する、  
請求項 8 に記載の抗体を検出する工程

16. 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖  
に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

17. 次の工程を含む、生体試料中の請求項 1 または請求項 2 に記載のポリヌクレ  
オチドの測定方法。

(1) 生体試料を請求項 16 に記載のポリヌクレオチドと接触させる工程、およ  
び

(2) 請求項 1 または請求項 2 に記載のポリヌクレオチドにハイブリダイズする、  
請求項 16 に記載のポリヌクレオチドを検出する工程

18. 請求項 16 に記載のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 または請求項 2 に記  
載のポリヌクレオチドの測定用キット。

19. 請求項 3 に記載のタンパク質または該タンパク質をコードする遺伝子の発現  
を指標に、該タンパク質を発現する細胞を検出または分離する方法。

20. 細胞がリウマチ滑膜細胞である、請求項 19 に記載の方法。

21. 細胞が未分化間葉系細胞である、請求項 19 に記載の方法。

22. 請求項 8 に記載の抗体を含む、請求項 3 に記載のタンパク質を発現する細胞  
の検出または分離用試薬。

23. 次の工程を含む、慢性関節リウマチの検出方法であって、慢性関節リウマチ  
のマーカが、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド、請求項 3 に記載のタンパ  
ク質、請求項 3 に記載のペプチド、請求項 3 に記載のタンパク質に結合する抗  
体、および請求項 3 に記載のペプチドに結合する抗体からなる群から選択され  
た少なくともひとつのマーカである方法。

i) 被検者の生体試料中に存在する慢性関節リウマチのマーカを検出する  
工程、および

ii) 工程 i) の検出結果を、慢性関節リウマチと関連付ける工程

24. 生体試料が被検者の血液であり、慢性関節リウマチのマーカが請求項3に記載のタンパク質に結合する抗体、および／または請求項3に記載のペプチドに結合する抗体である請求項23に記載の方法。
25. 生体試料が被検者の滑膜組織または滑膜細胞であり、慢性関節リウマチのマーカが請求項1に記載のポリヌクレオチド、および／または請求項3に記載のタンパク質である請求項23に記載の方法。
26. 次の工程を含む、被験化合物の請求項3に記載のタンパク質またはペプチドと結合する活性の検出方法。
- a) 被験化合物を請求項3に記載のタンパク質またはペプチドと接触させる工程、および
  - b) 被験化合物と前記タンパク質またはペプチドとの結合を観察する工程
27. 次の工程を含む、請求項3に記載のタンパク質またはペプチドと結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法。
- a) 請求項26に記載の方法によって被験化合物の請求項3に記載の蛋白質またはペプチドに対する結合活性を検出する工程、および
  - b) 対照と比較して前記結合活性が高い被験化合物を選択する工程
28. 次の工程を含む、請求項3に記載のタンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性の検出方法。
- a) 被験化合物存在下で請求項3に記載のタンパク質またはペプチドとそのリガンドとを接触させる工程、および
  - b) 前記タンパク質またはペプチドに結合するリガンド、および／または被験化合物を検出する工程
29. リガンドがシノビオリンリガンドS1-5である請求項28に記載の方法。
30. 次の工程を含む、請求項3に記載のタンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法。
- a) 請求項28に記載の方法によって、被験化合物の請求項3に記載のタンパ

- ク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を検出する工程、および
- b) 対照と比較して前記阻害活性が高い被験化合物を選択する工程
- 3 1. 次の工程を含む、被験化合物の請求項 3 に記載のタンパク質によるシグナル伝達を調節する活性を検出する方法。
- a) 前記タンパク質のリガンドの存在下または不存在下で、被験化合物と前記タンパク質を接触させる工程、および
- b) 前記タンパク質を介するシグナル伝達を検出する工程
- 3 2. 次の工程を含む、請求項 3 に記載のタンパク質によるシグナル伝達を調節する活性を有する化合物のスクリーニング方法。
- a) 請求項 3 1 に記載の方法によって、被験化合物の前記タンパク質によるシグナル伝達を調節する活性を検出する工程、および
- b) 対照と比較して前記調節の活性が高い被験化合物を選択する工程
- 3 3. 次の工程を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの発現を調節する活性の検出方法であって、
- a) 被験化合物の存在下で請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞を培養する工程、および
- b) 前記ポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、
- 3 4. 次の工程を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの発現を調節する化合物のスクリーニング方法。
- a) 請求項 3 3 に記載の方法によって、被験化合物の請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの発現を調節する活性を検出する工程、および
- b) 対照と比較して前記活性に差を有する被験化合物を選択する工程
- 3 5. 請求項 2 7 に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含む、シノビオリン刺激剤。
- 3 6. 請求項 3 0 に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含む、シノビオリンとシノビオリンリガンドとの結合阻害剤。

37. 請求項30または請求項32のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含む、滑膜増生阻害剤。
38. 請求項1若しくは請求項2に記載のポリヌクレオチド、請求項3に記載の蛋白質若しくはペプチド、および請求項5に記載のベクターからなる群から選択されるいずれかの成分を有効成分として含有する医薬組成物。
39. 請求項1または請求項2に記載のポリヌクレオチドの発現が改変されているか、または該改変を誘導することができるトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
40. 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドが外来的に導入されている、請求項39に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
41. 慢性関節リウマチモデル動物である、請求項40に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
42. 内因性に持つ請求項1または請求項2のいずれかに記載のポリヌクレオチドの発現が抑制されているトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
43. 他の遺伝子がノックインされている、請求項42に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
44. 請求項40または請求項42に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物に由来する細胞。
45. 次の工程を含む、請求項1または請求項2に記載のポリヌクレオチドの内因性プロモーターの活性を調節する活性の検出方法。
- a) 請求項1または請求項2に記載のポリヌクレオチドの内因性プロモーターの制御下にレポーター遺伝子を発現することができる発現系に、被験化合物を接触させる工程、および
  - b) レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程
46. 前記発現系が、請求項43に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物またはこの動物に由来する細胞である請求項45に記載の方法。
47. 次の工程を含む、請求項1または請求項2に記載のポリヌクレオチドの内因

性プロモーターの活性を調節する化合物のスクリーニング方法。

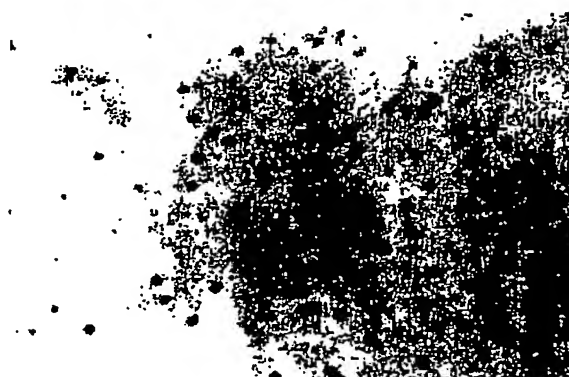
- a) 請求項 4 5 に記載の方法によって、被験化合物の請求項 1 または請求項 2 に記載のポリヌクレオチドの内因性プロモーターの活性を調節する活性を測定する工程、および
  - b) 対照と比較して、前記活性に差がある被験化合物を選択する工程
48. 請求項 3 4、または請求項 4 7 に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの発現を調節するための医薬組成物。

1 / 46

図 1



対照

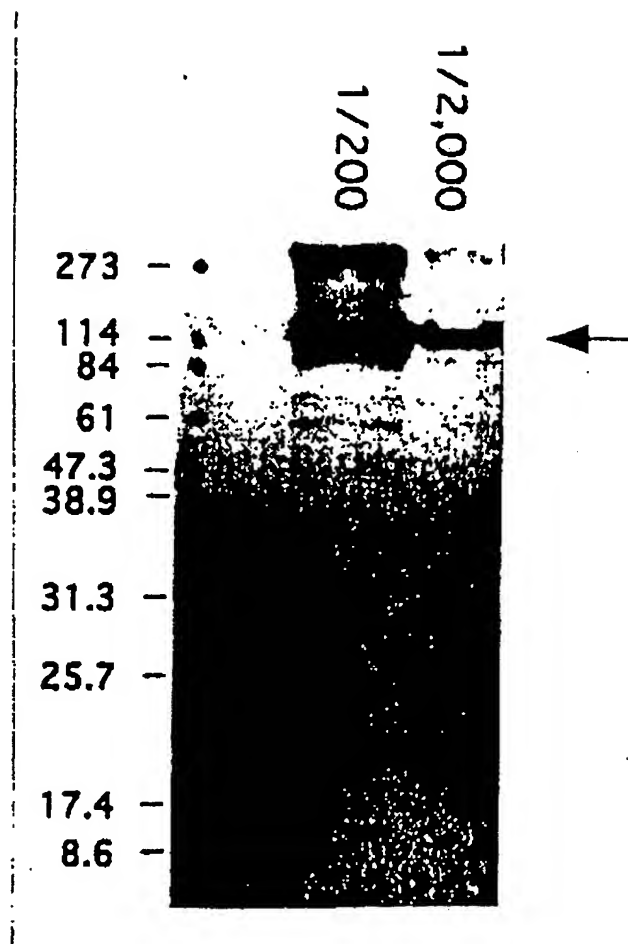


シノビオリン



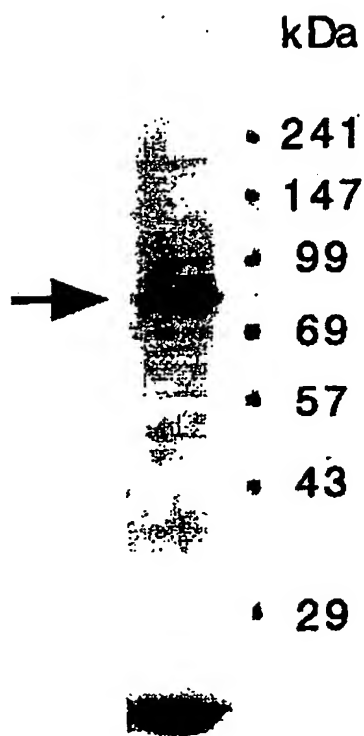
2 / 4 6

図 2



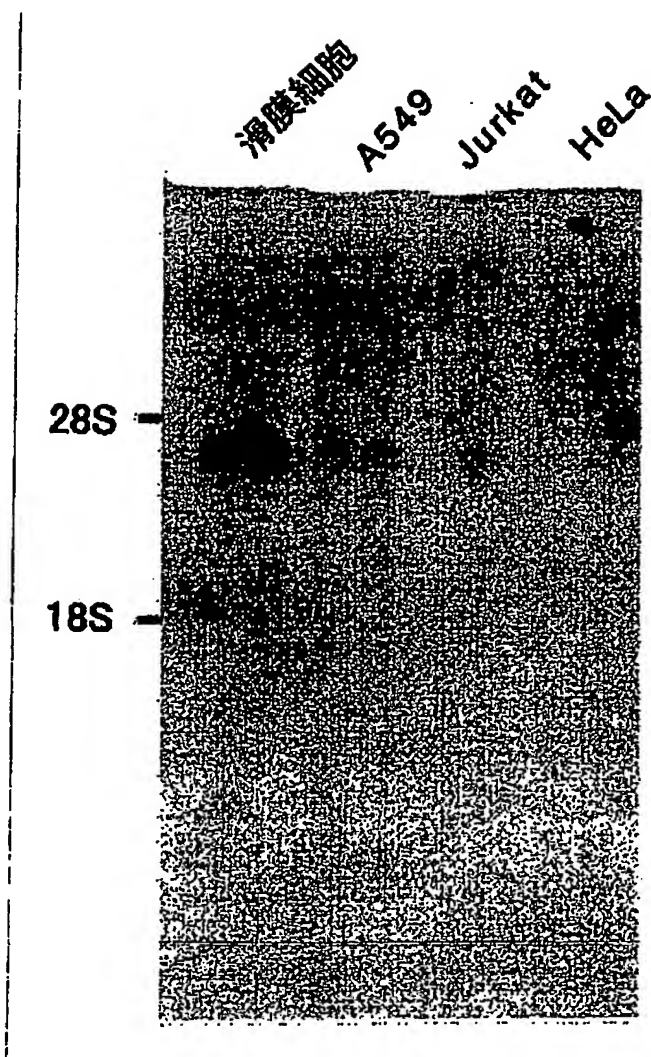
3 / 4 6

☒ 3



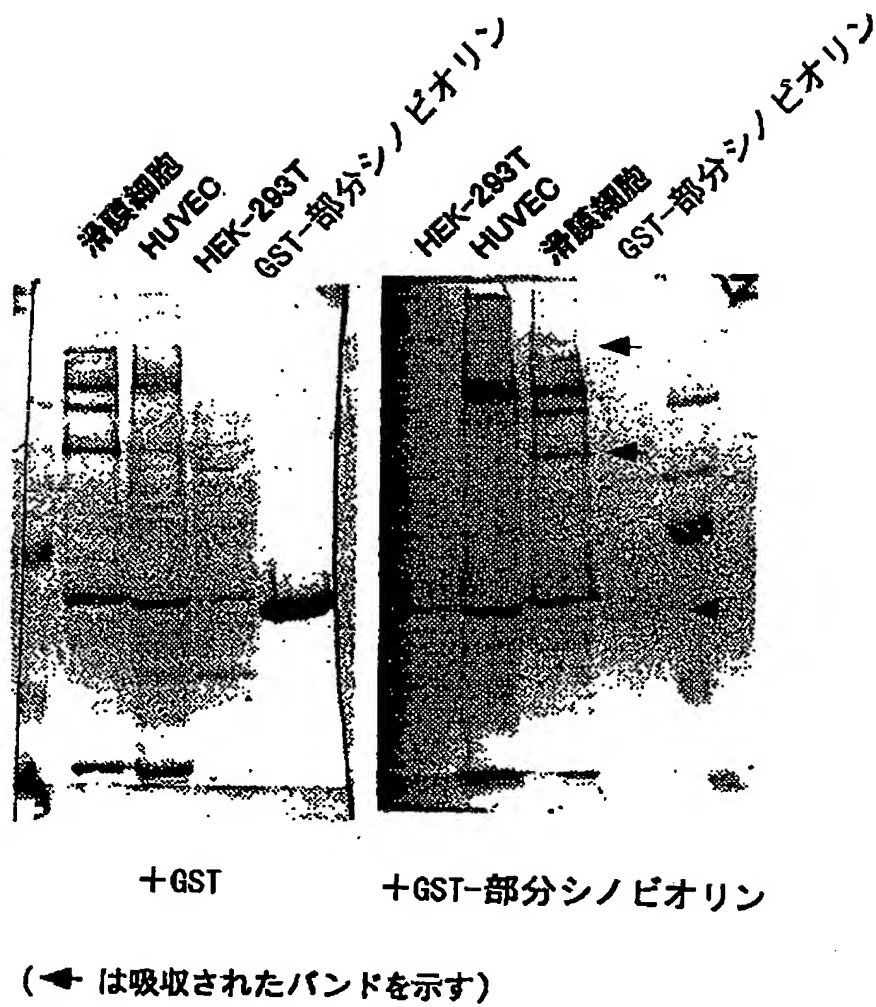
4 / 46

図 4



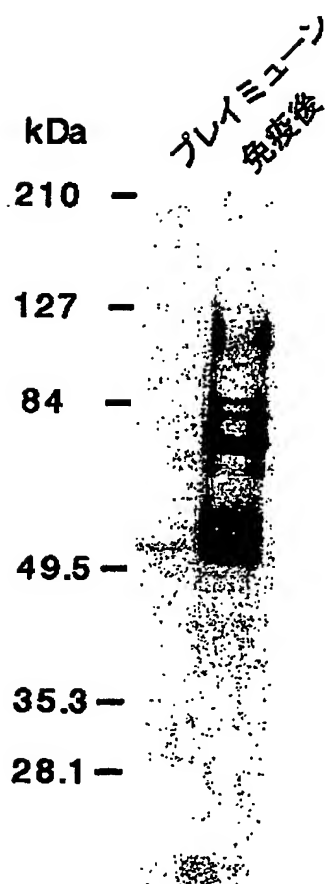
5 / 46

図 5



6 / 46

図 6



プレイミューン；滑膜細胞免疫前ウサギ抗血清

免疫後；滑膜細胞抗血清

7 / 46

図 7

**A 抗滑膜細胞抗血清による滑膜細胞の蛍光免疫染色**

抗滑膜細胞抗血清



+GST-部分シノビオリン

**B 精製抗滑膜細胞抗体による蛍光免疫染色**

GSTカラム溶出画分

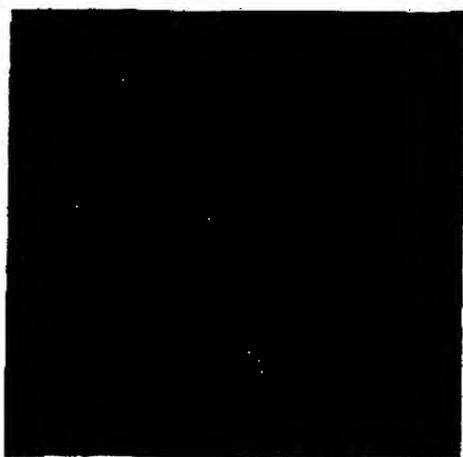
GST-部分シノビオリンカラム  
溶出画分

図8



抗滑膜細胞抗血清



抗滑膜細胞抗血清+GST



抗滑膜細胞抗血清+  
GST-部分シノビオリン

図9



GST-GSカラムによる精製

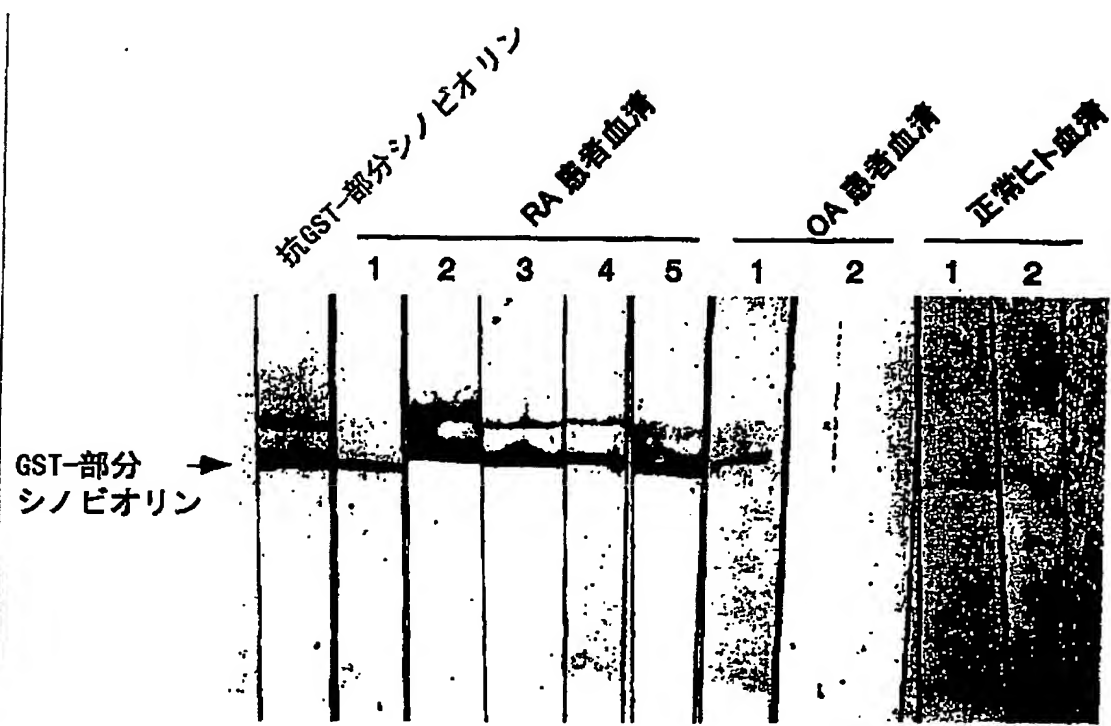


GST-部分シノビオリン  
-GSカラムによる精製



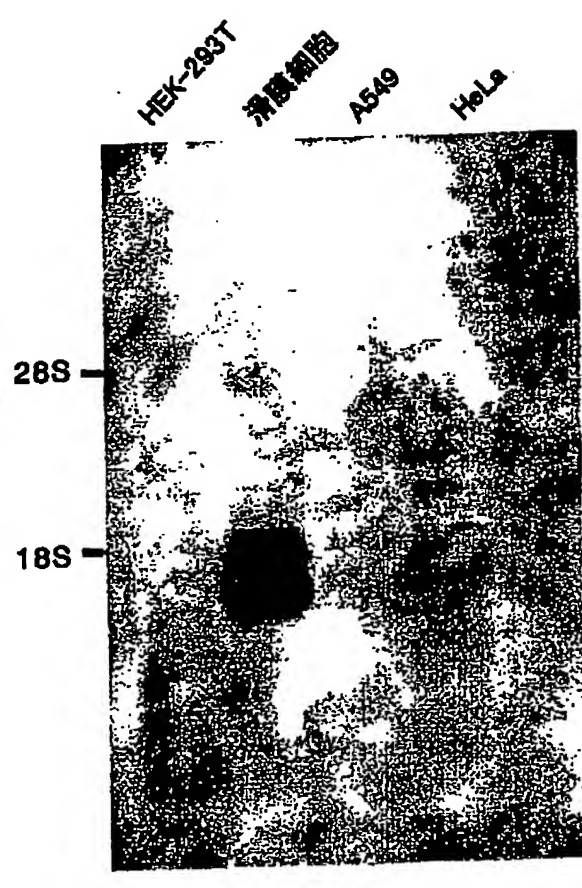
10/46

図10



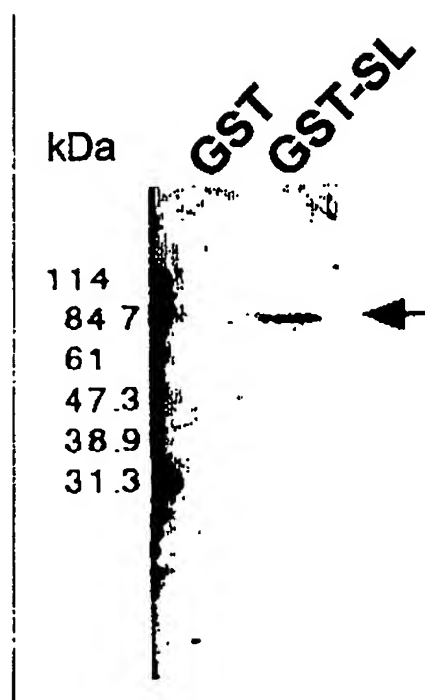
11 / 46

図 11



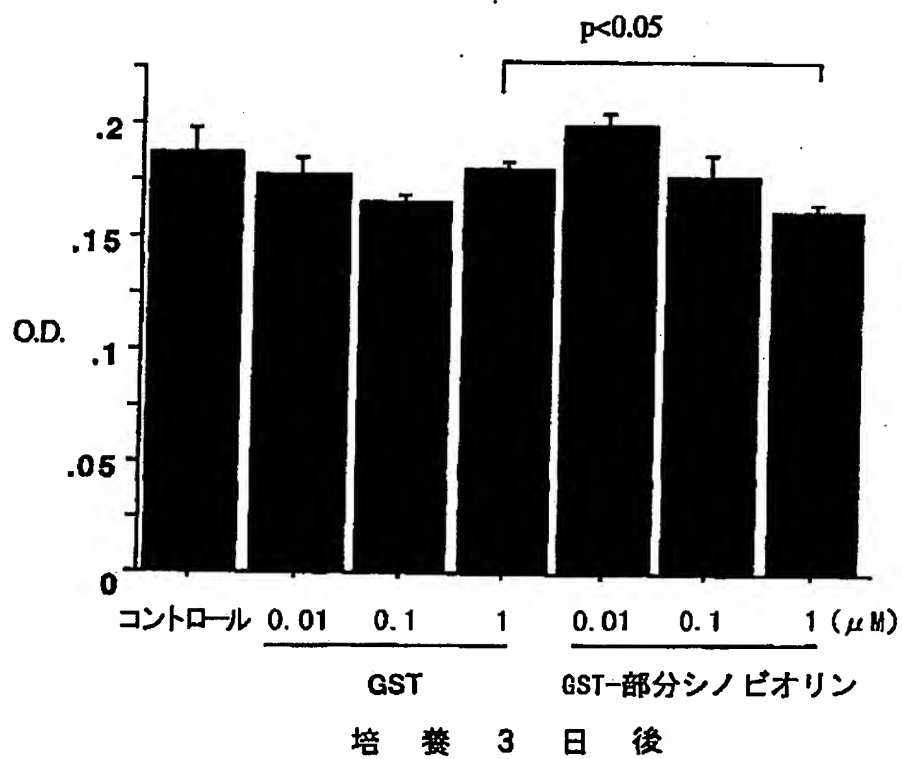
12/46

図 12

プローブ ; [ $^{35}\text{S}$ ]HA-シノビオリン-HAHA

13/46

図13



14/46

図14

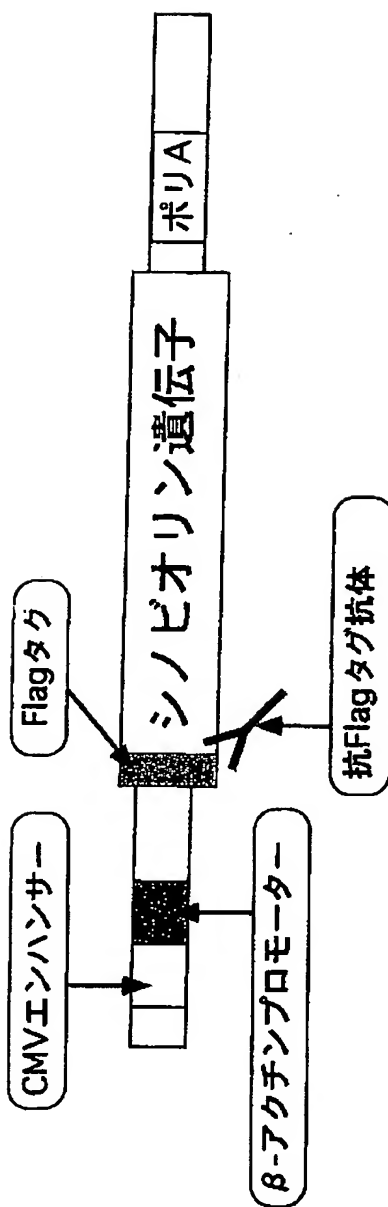
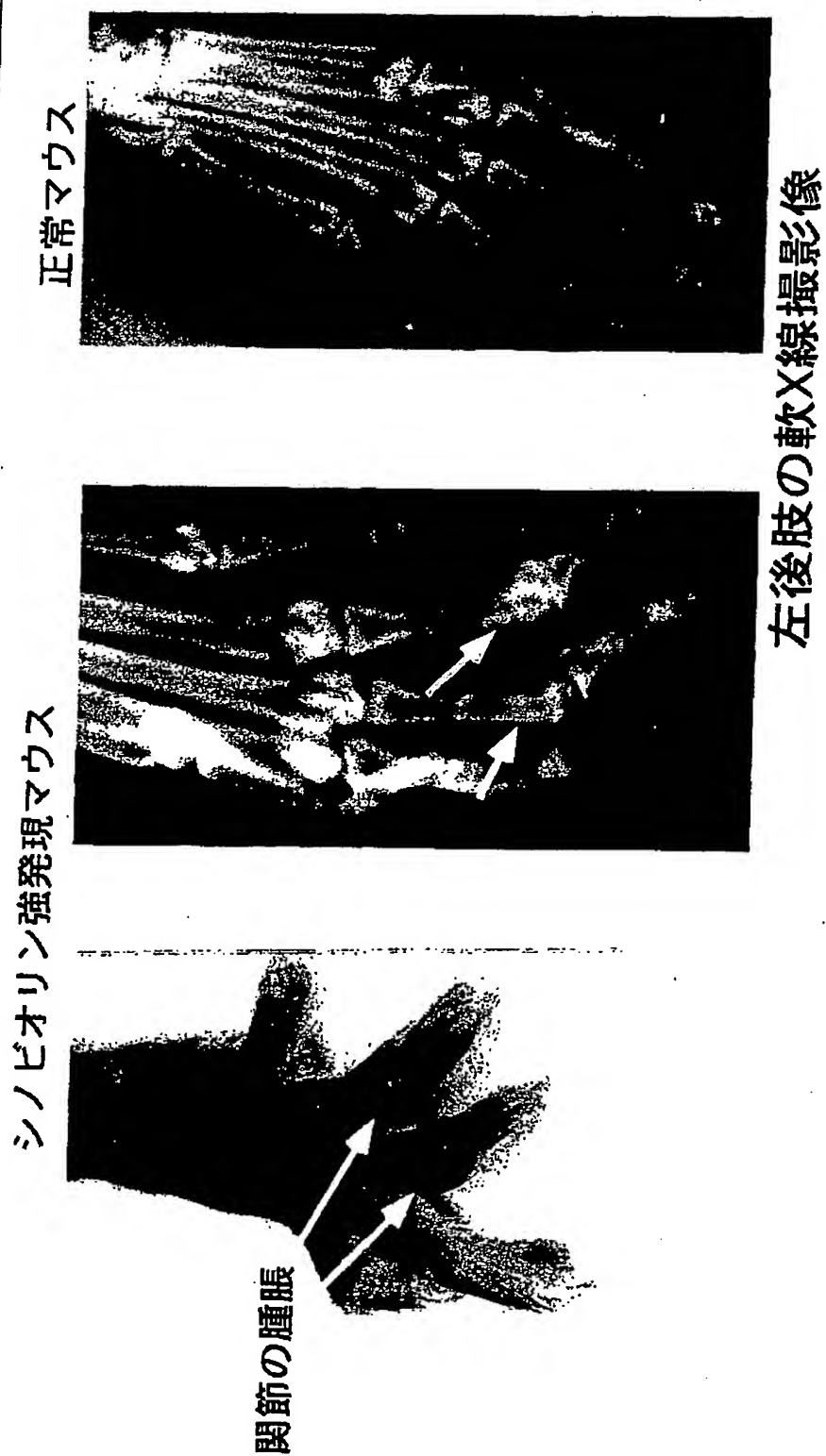
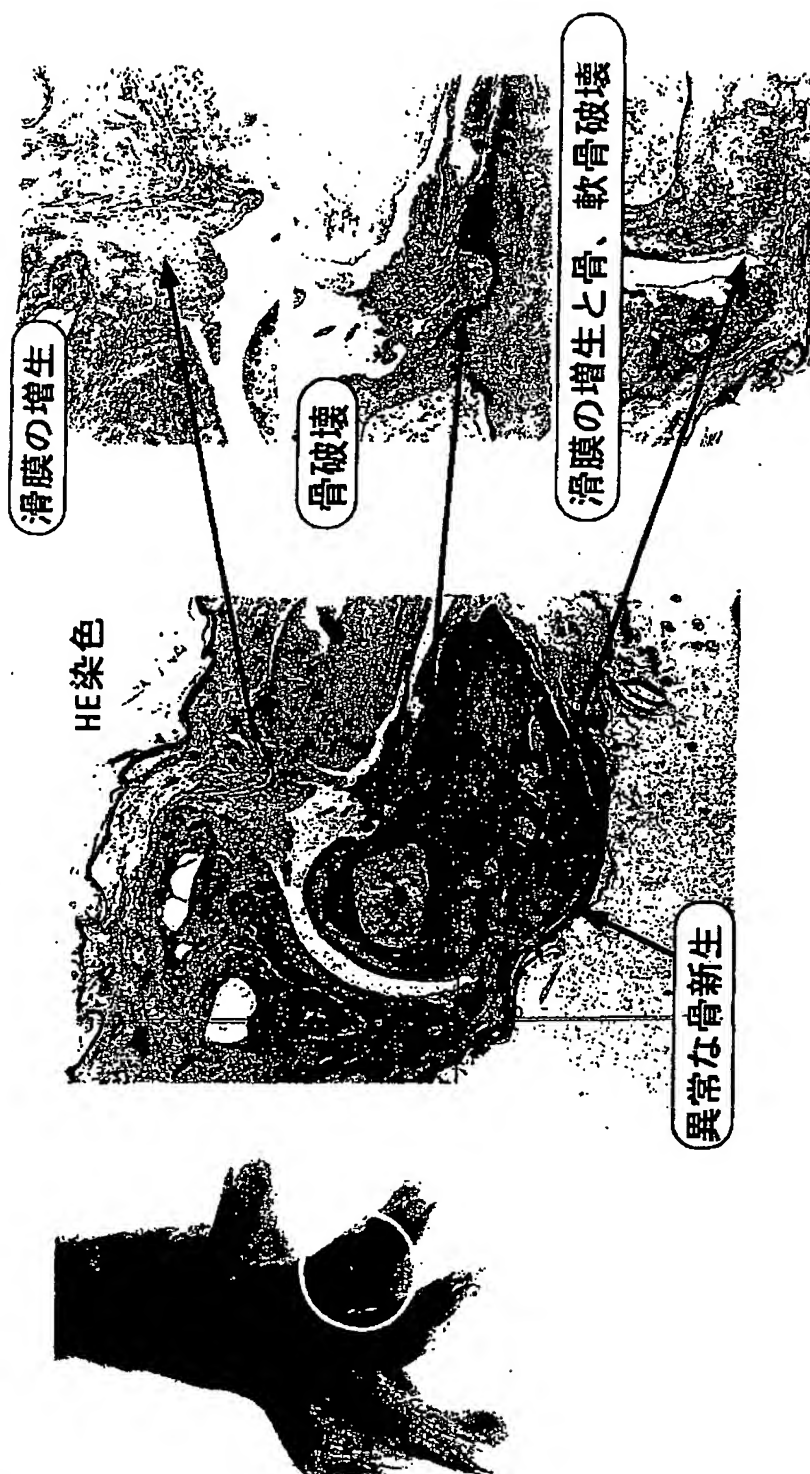


図15



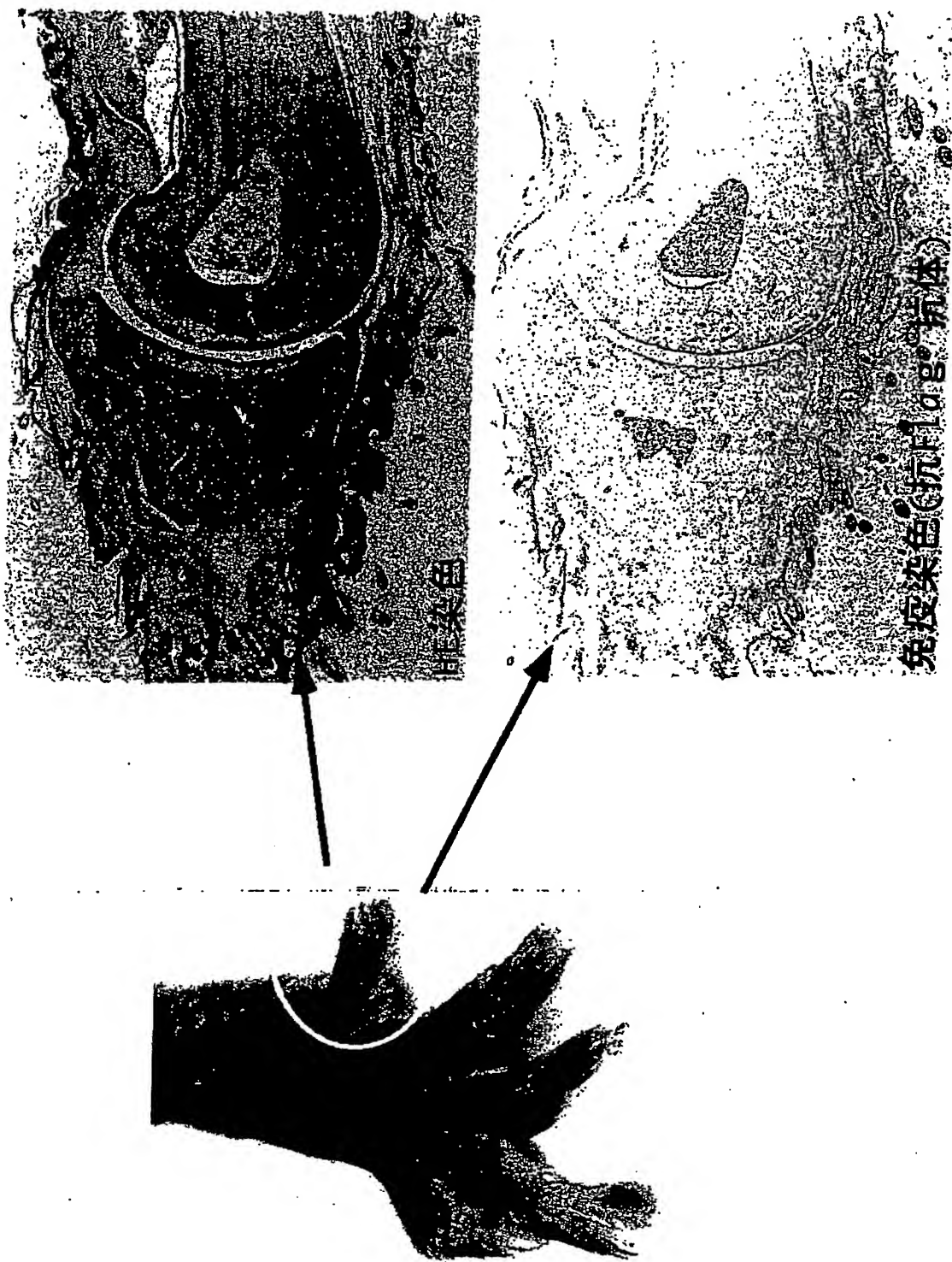
16 / 46

図 16



17/46

図 17





18/46

図 18

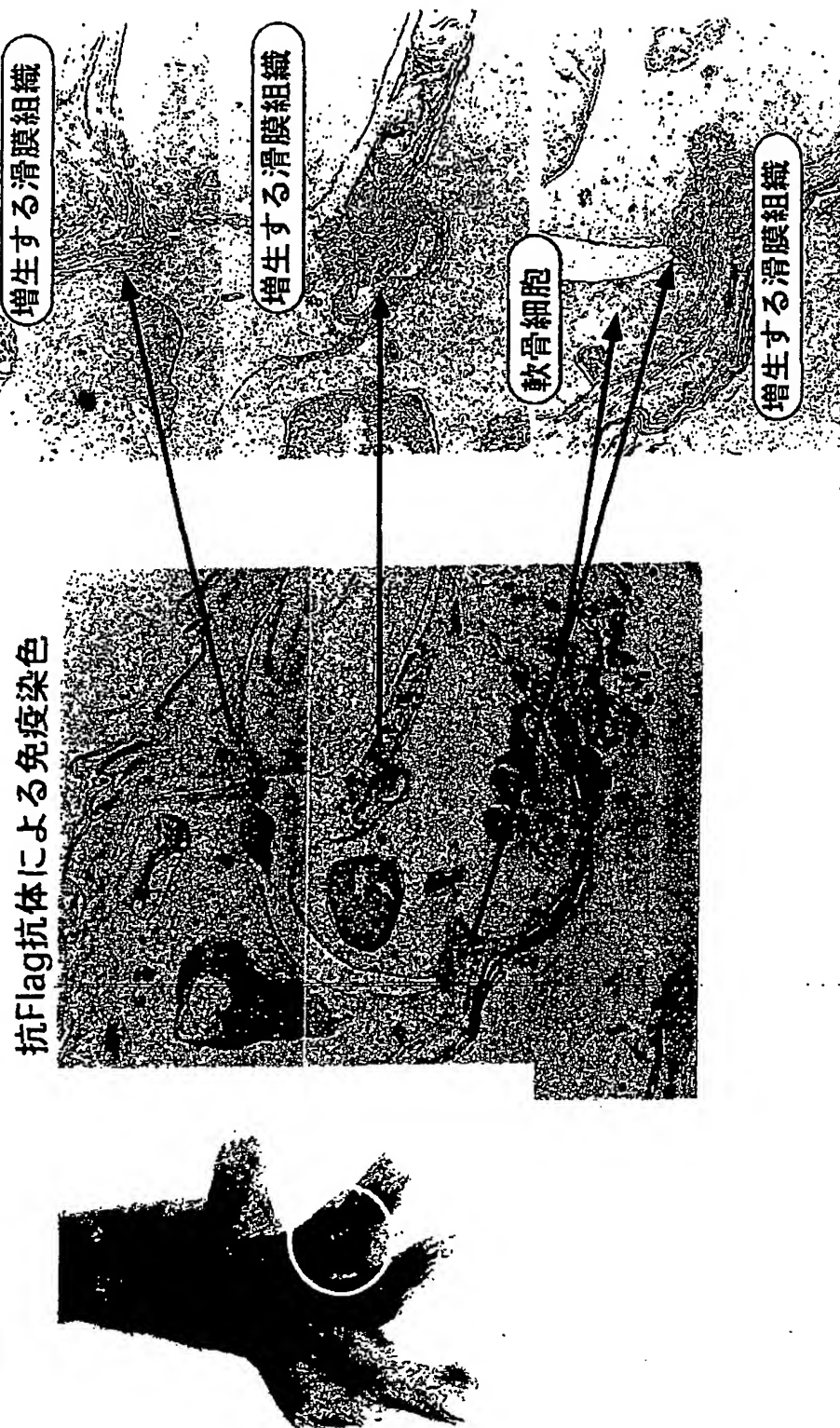
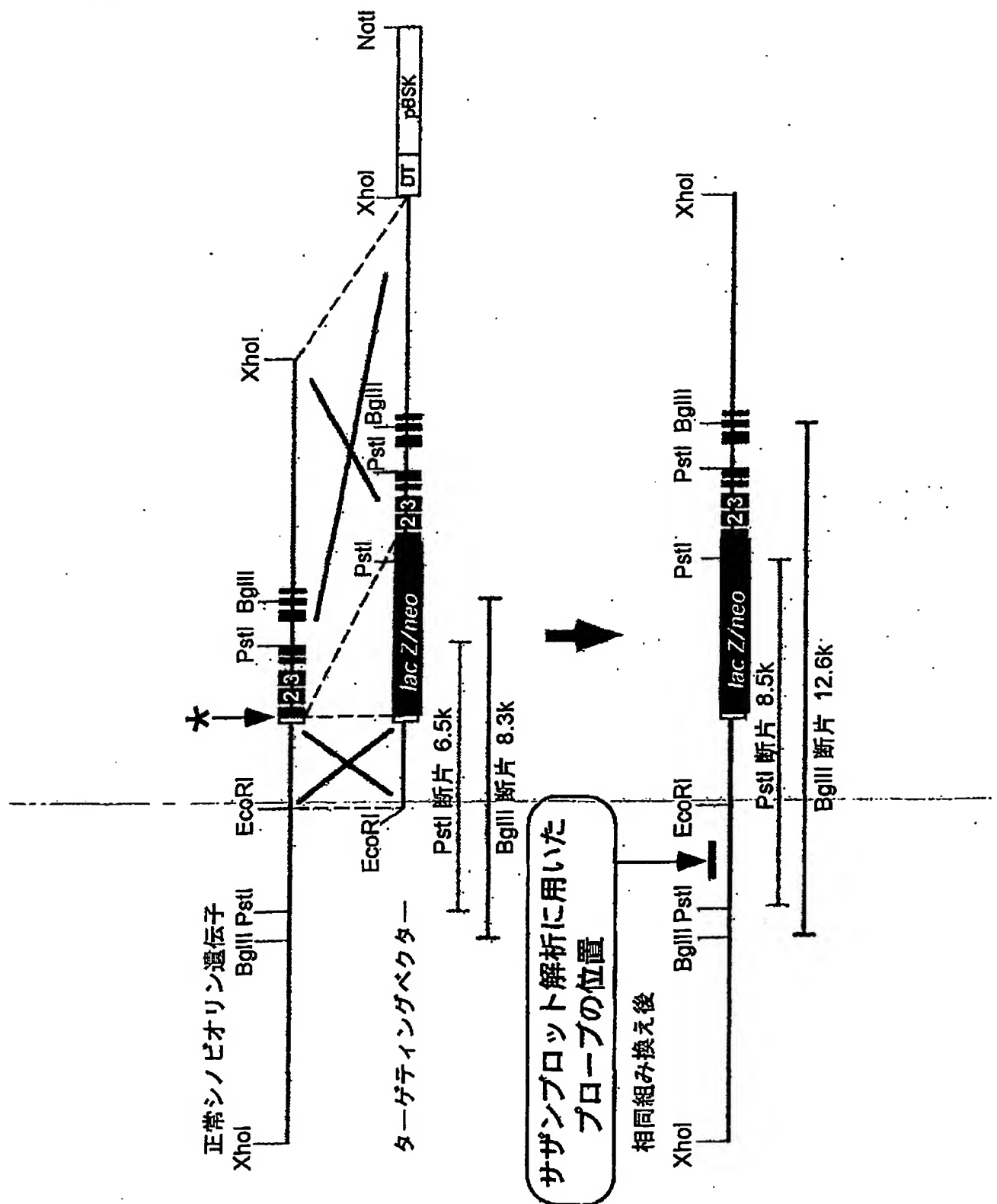
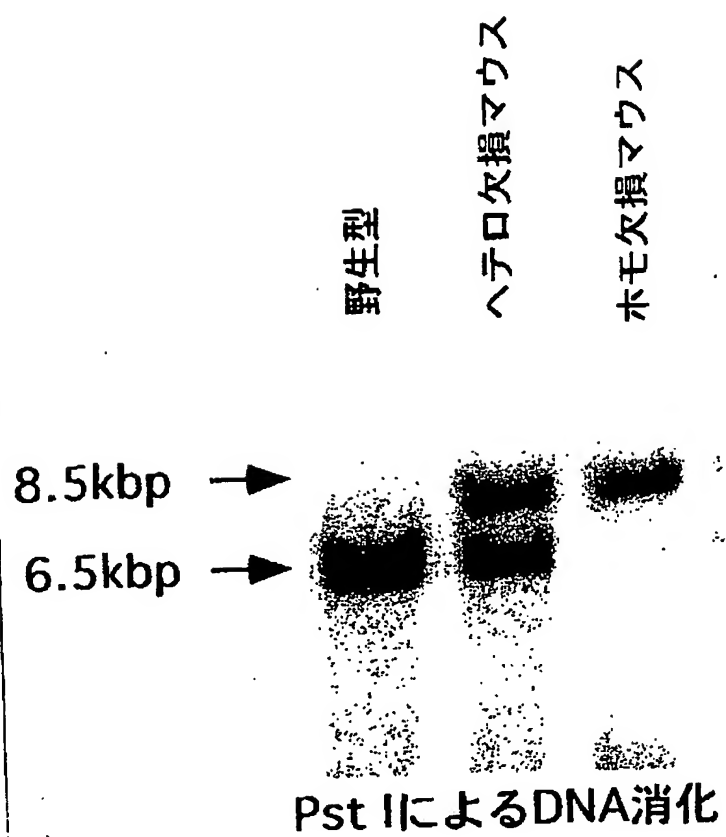


図 19



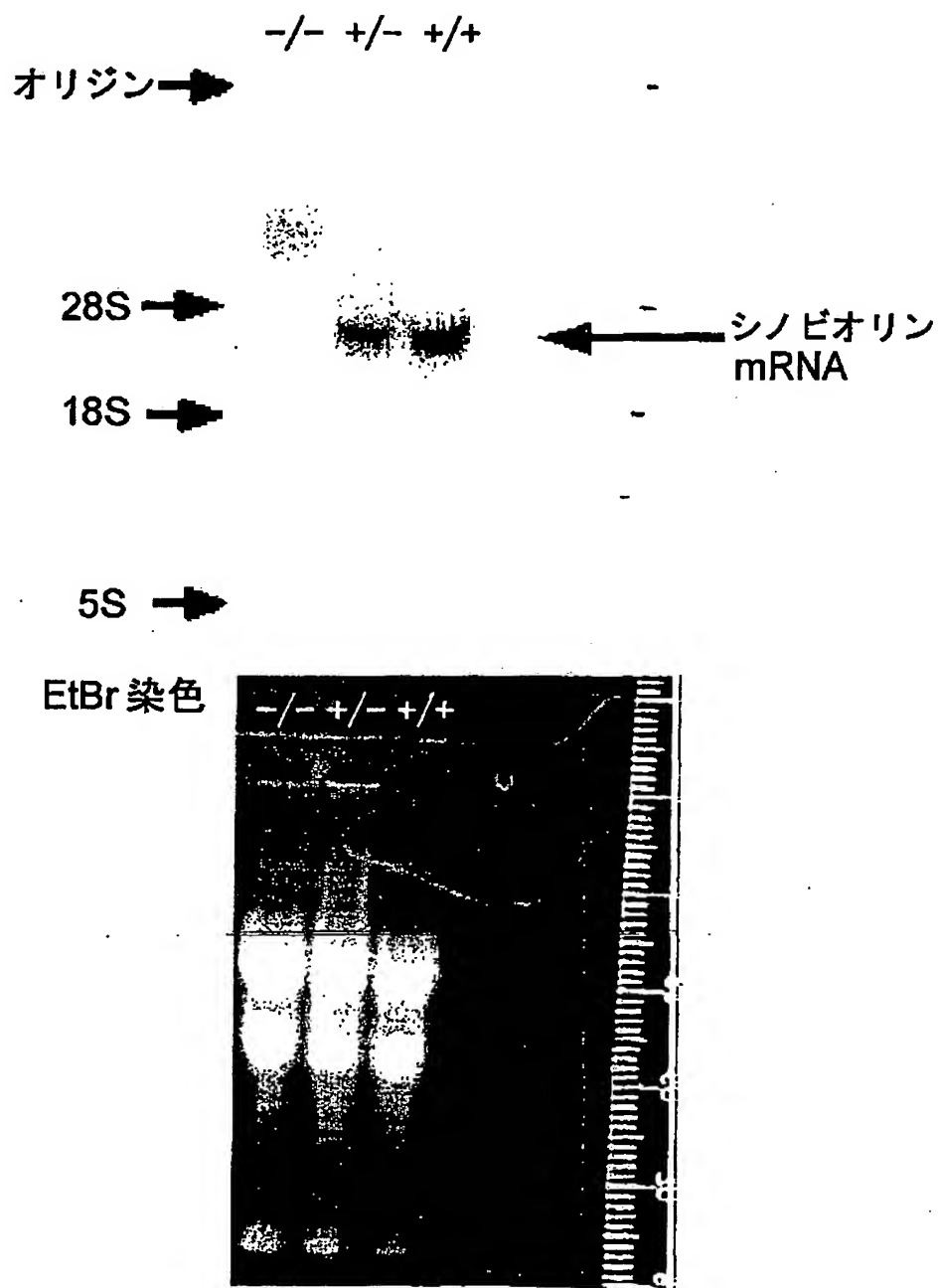
20/46

図20



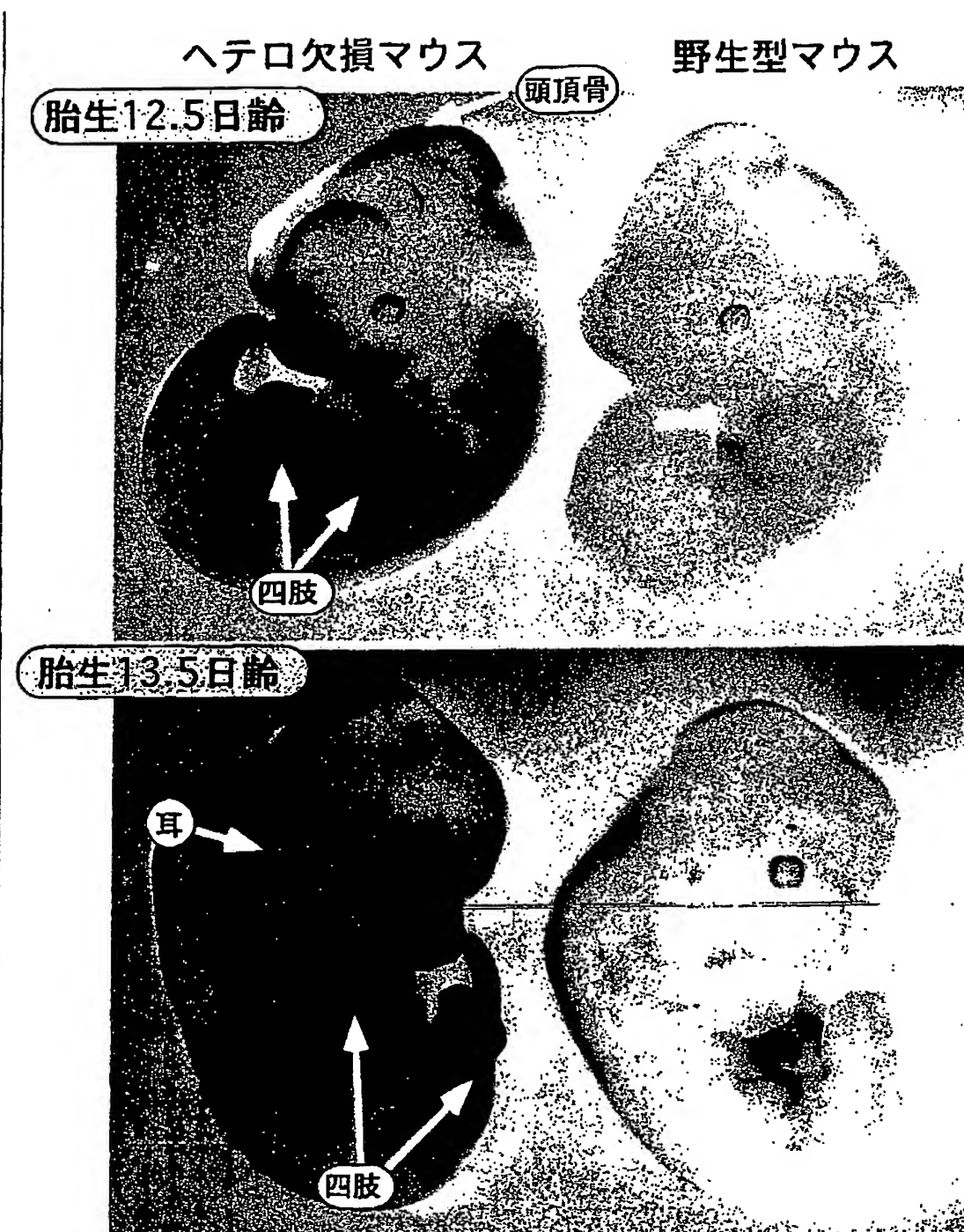
21/46

図 21



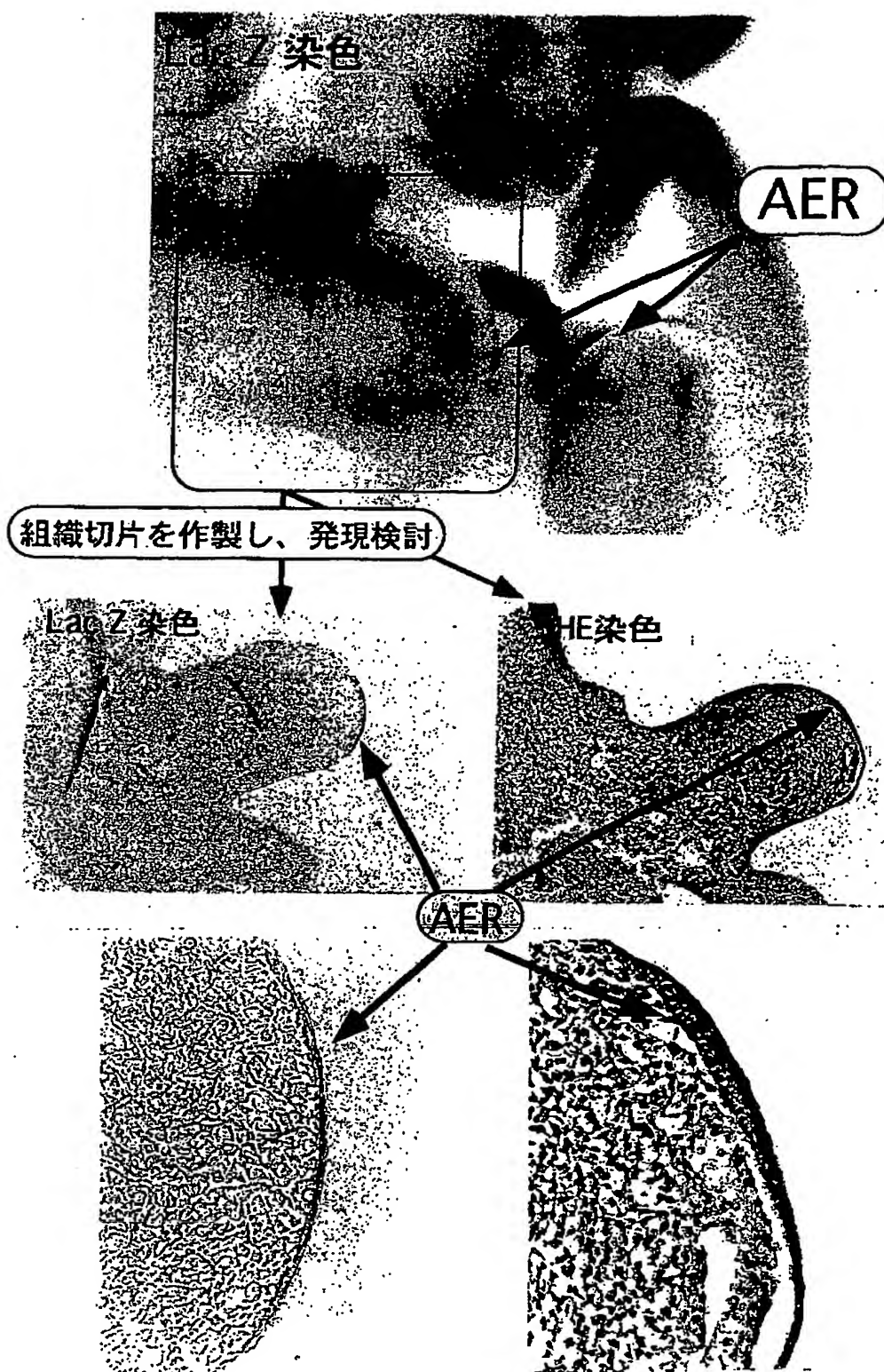
22/46

図 22



23/46

図 23



24 / 46

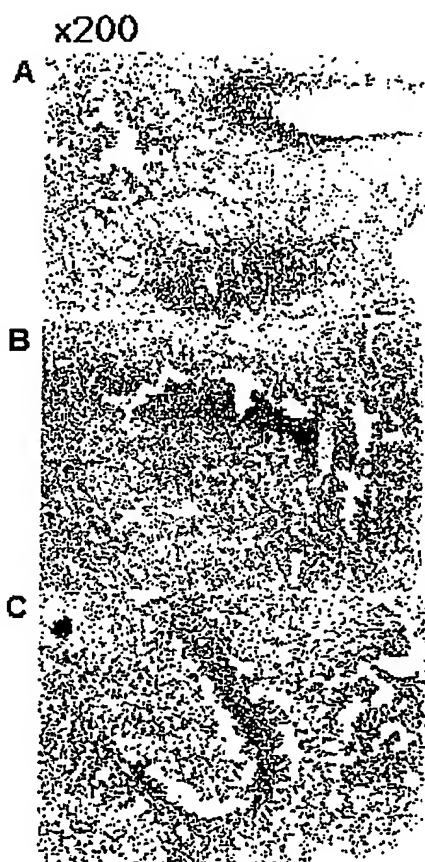
図 24

ヘテロ x40



25/46

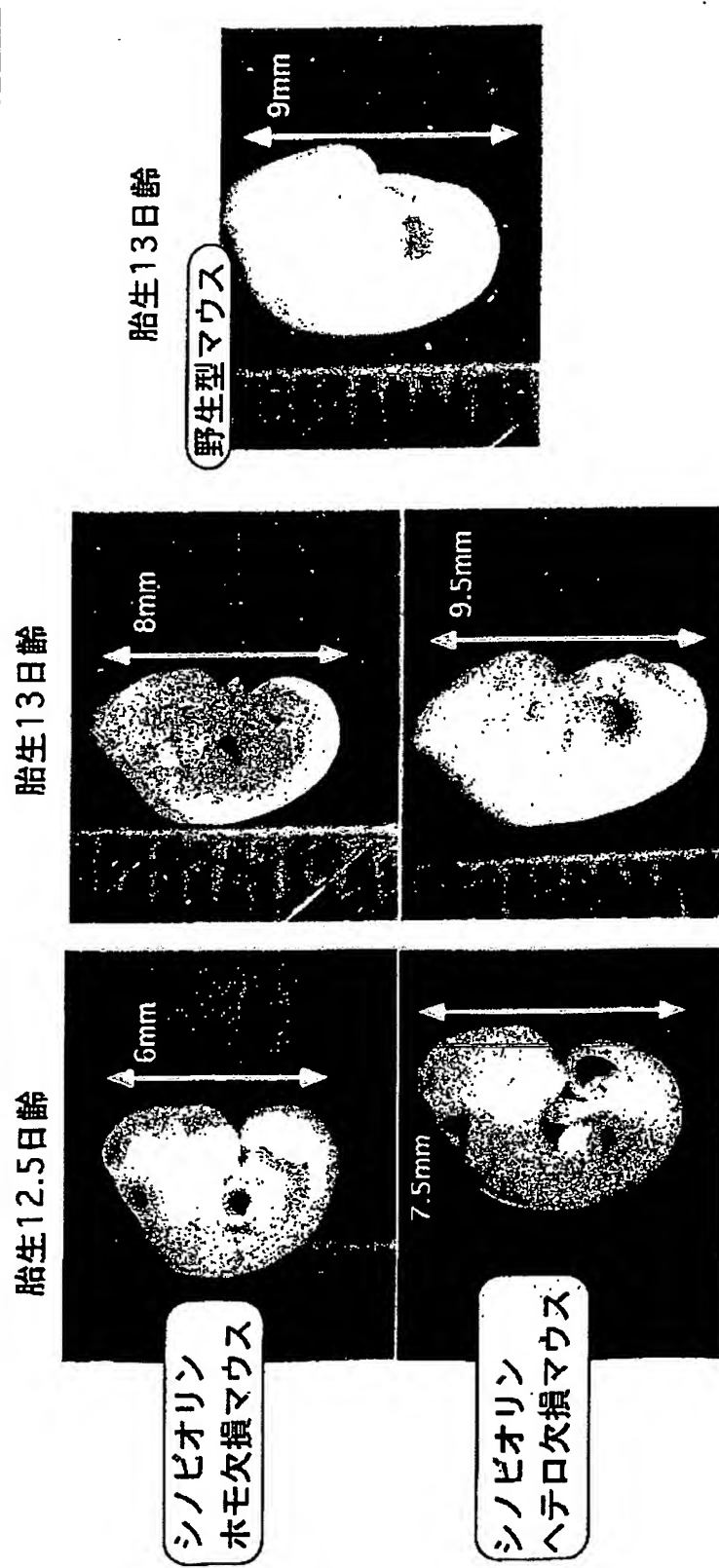
図 25





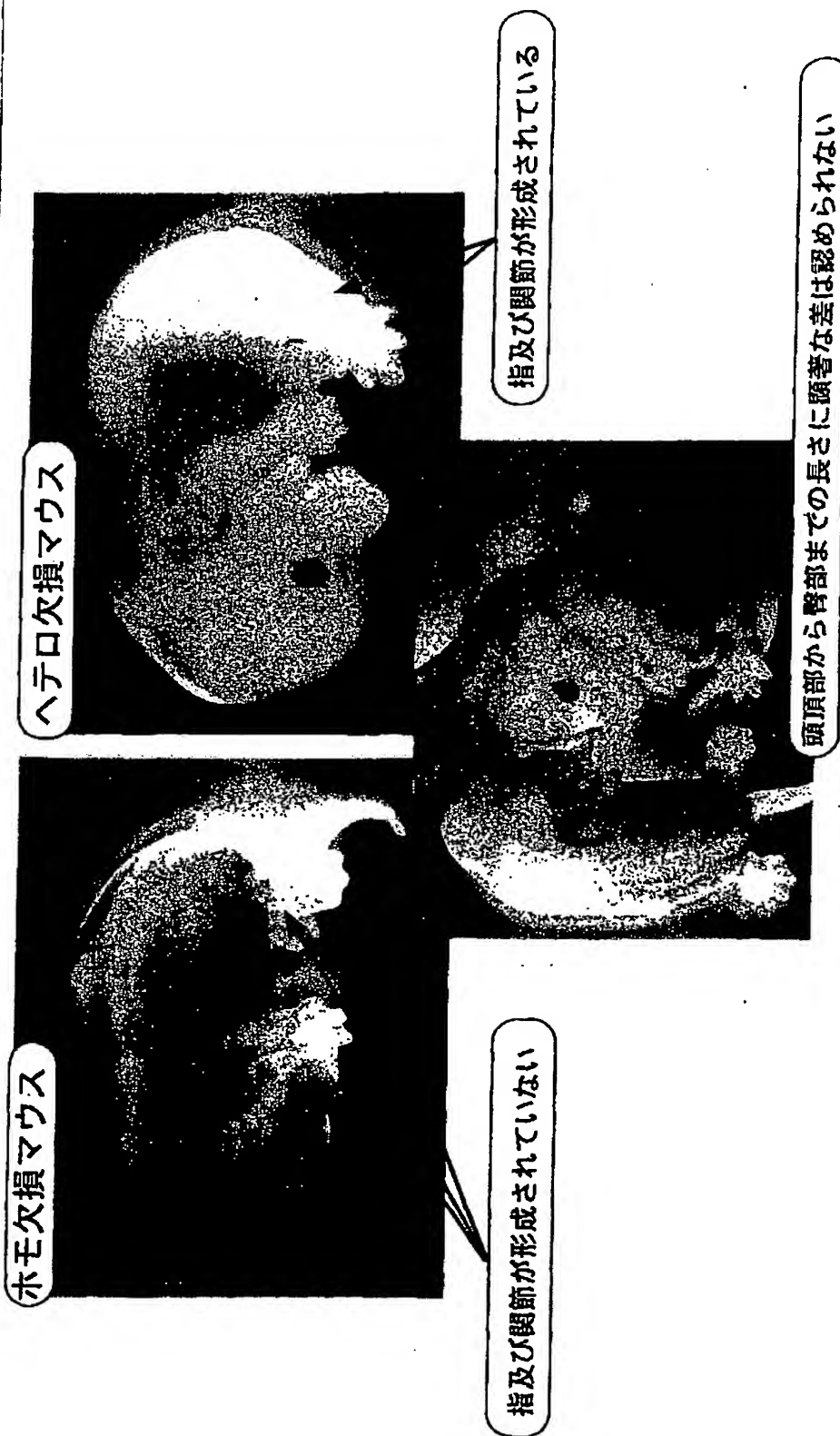
26 / 46

図 26



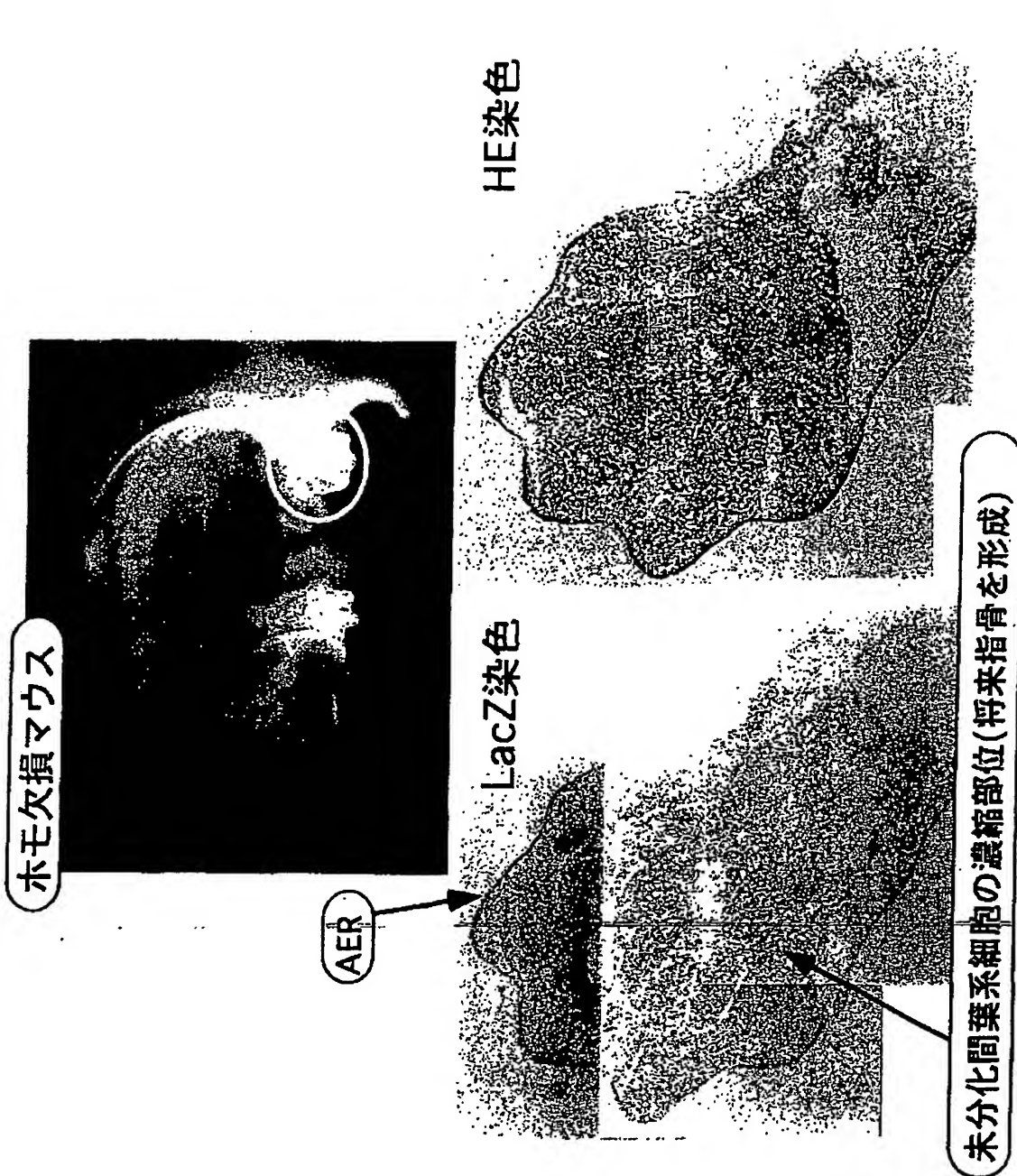
27 / 46

図 27



28/46

図28



29/46

図 29

ホモ欠損マウス

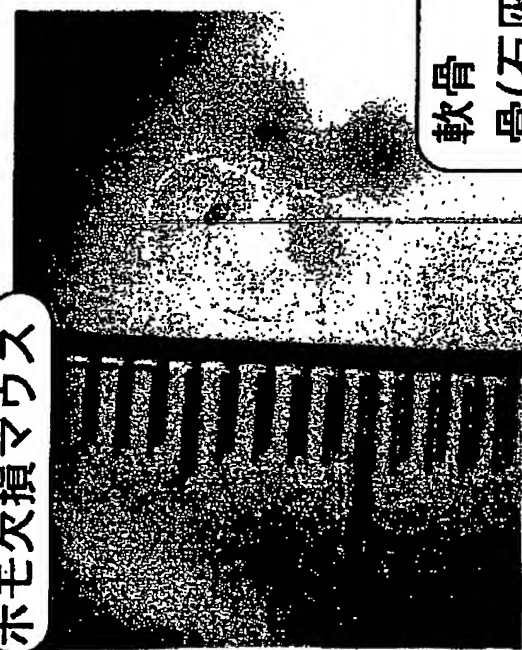
ヘテロ欠損マウス



図 30

アルシヤンブルー、アリザリンレッド染色

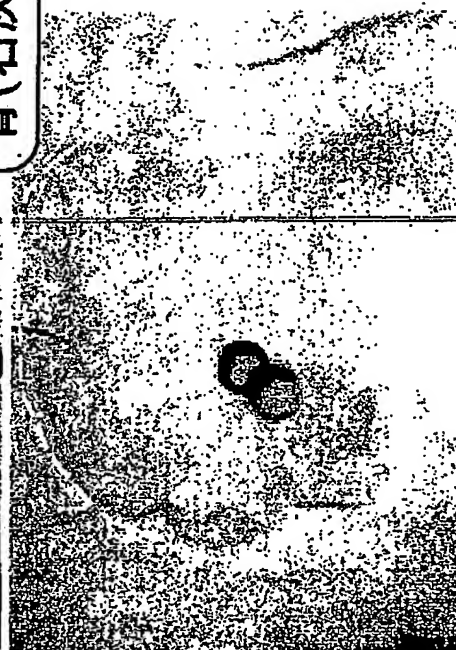
ホモ欠損マウス



ヘテロ欠損マウス

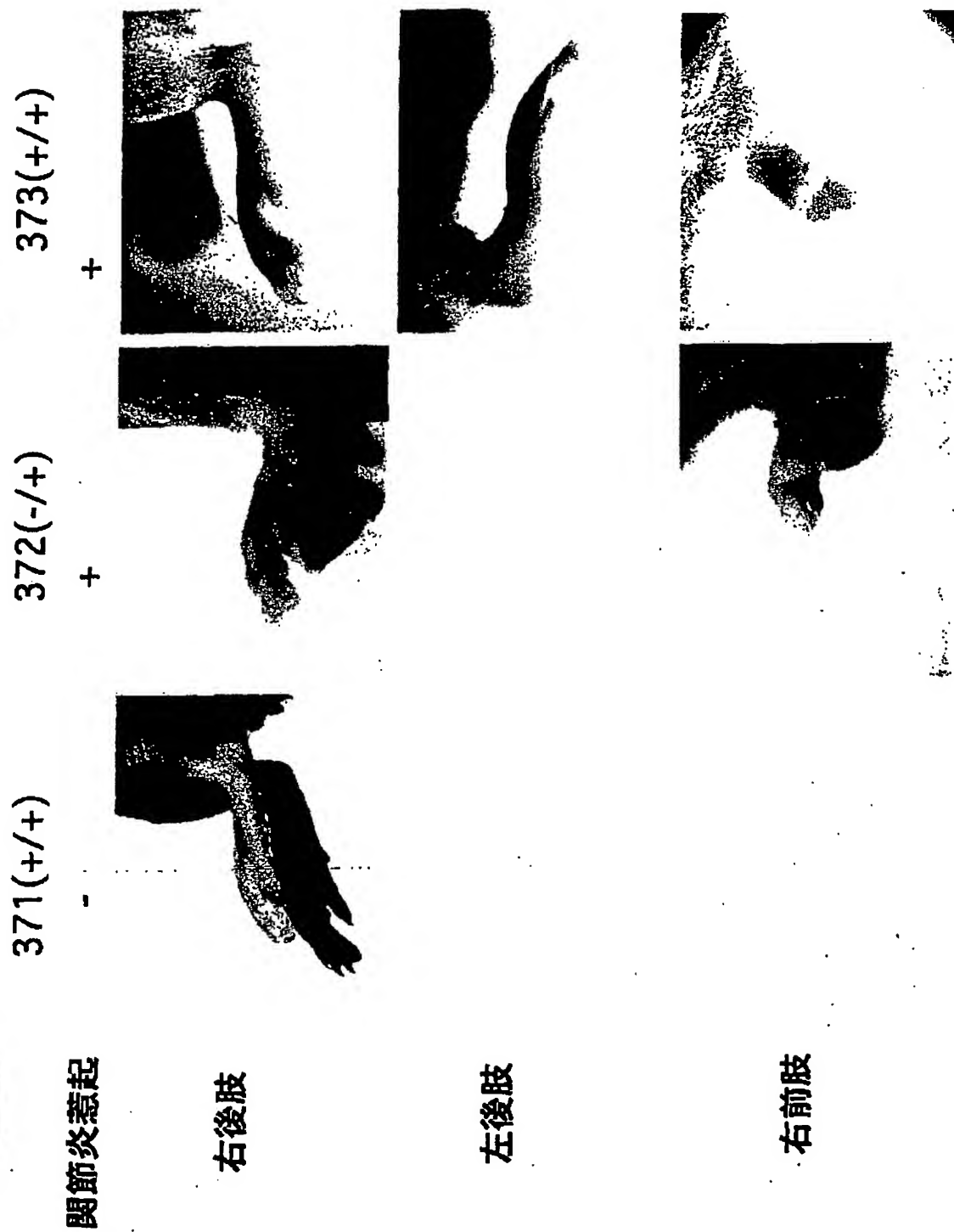


軟骨 ; ブルー  
骨(石灰化) ; レッド



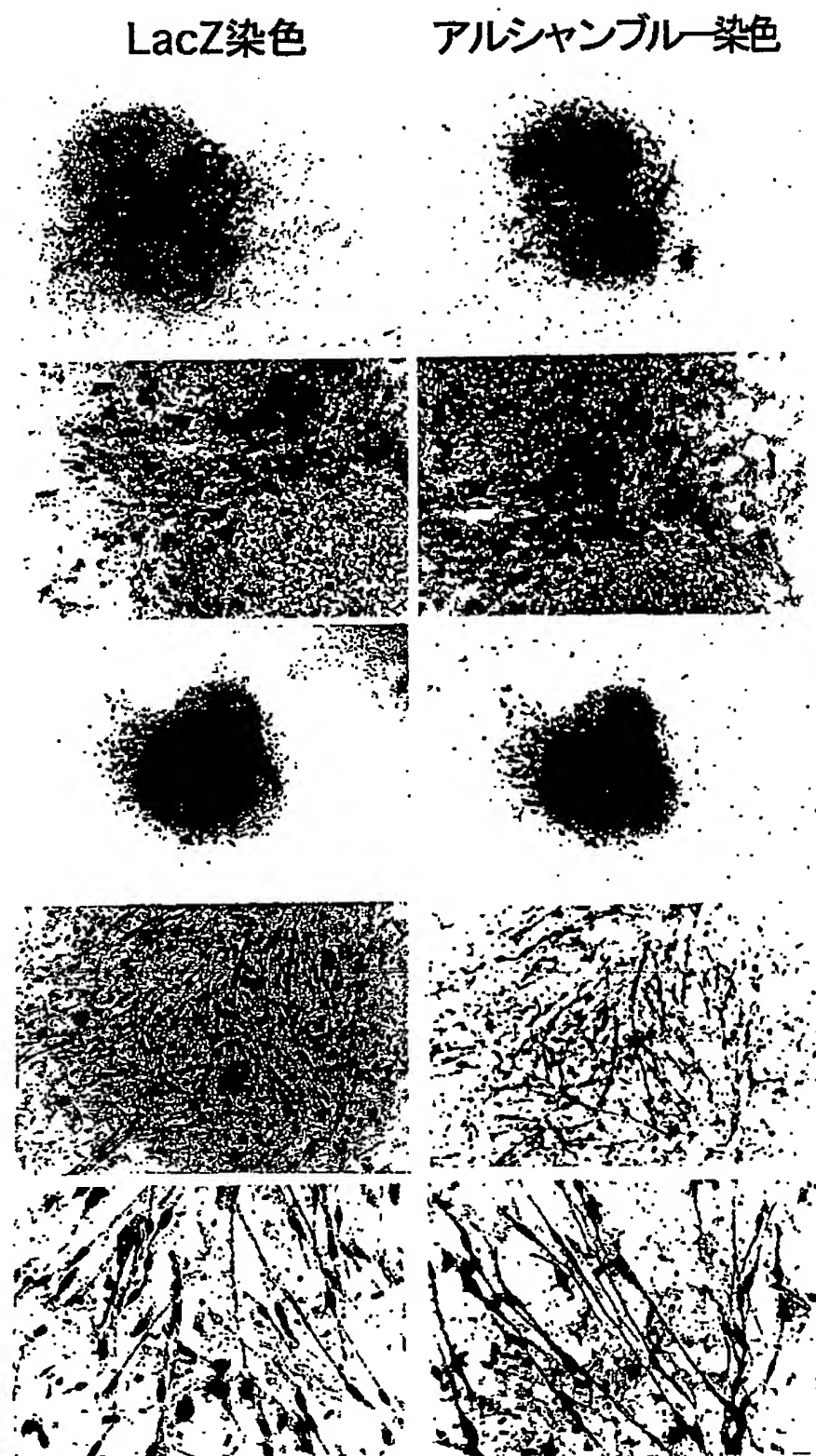
31/46

図 3 1



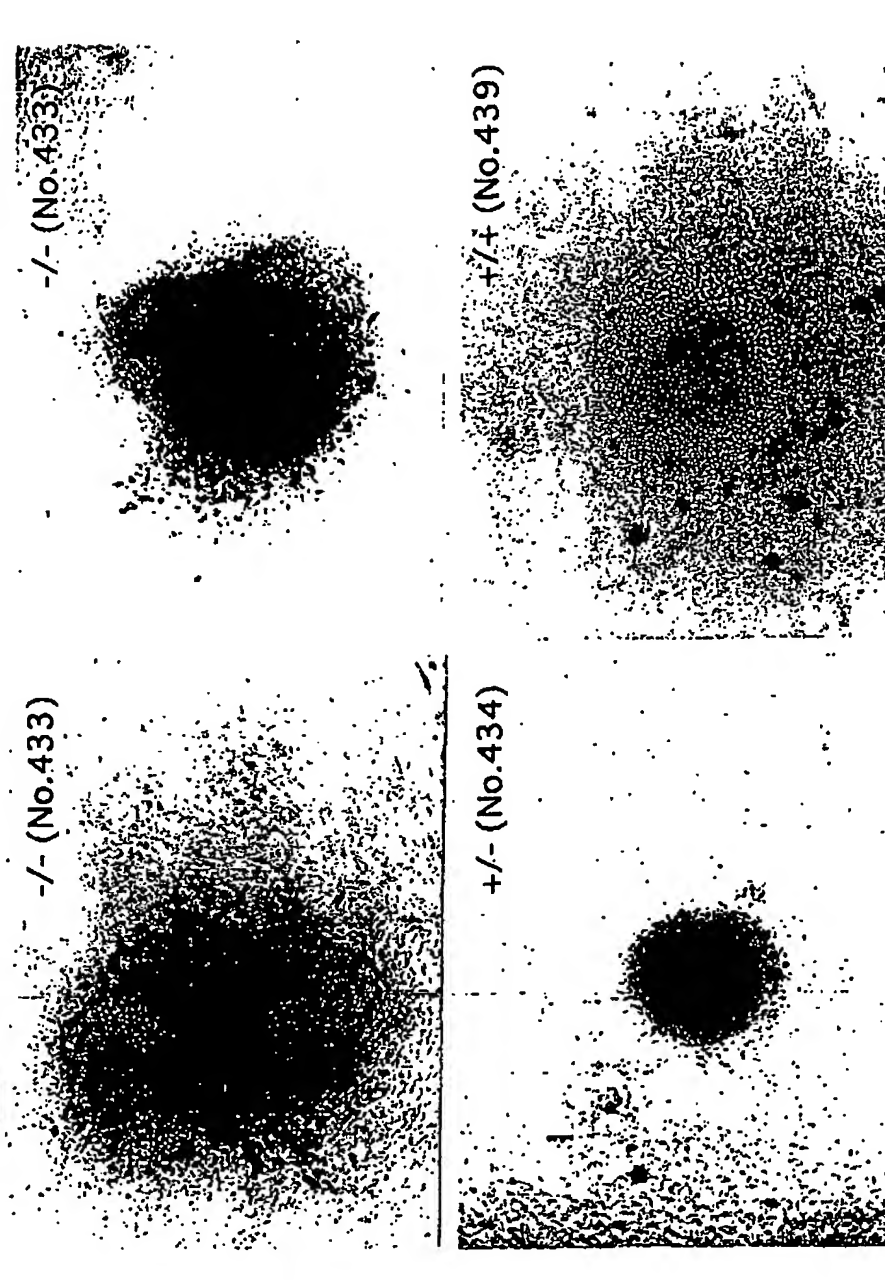
32/46

図32



33/46

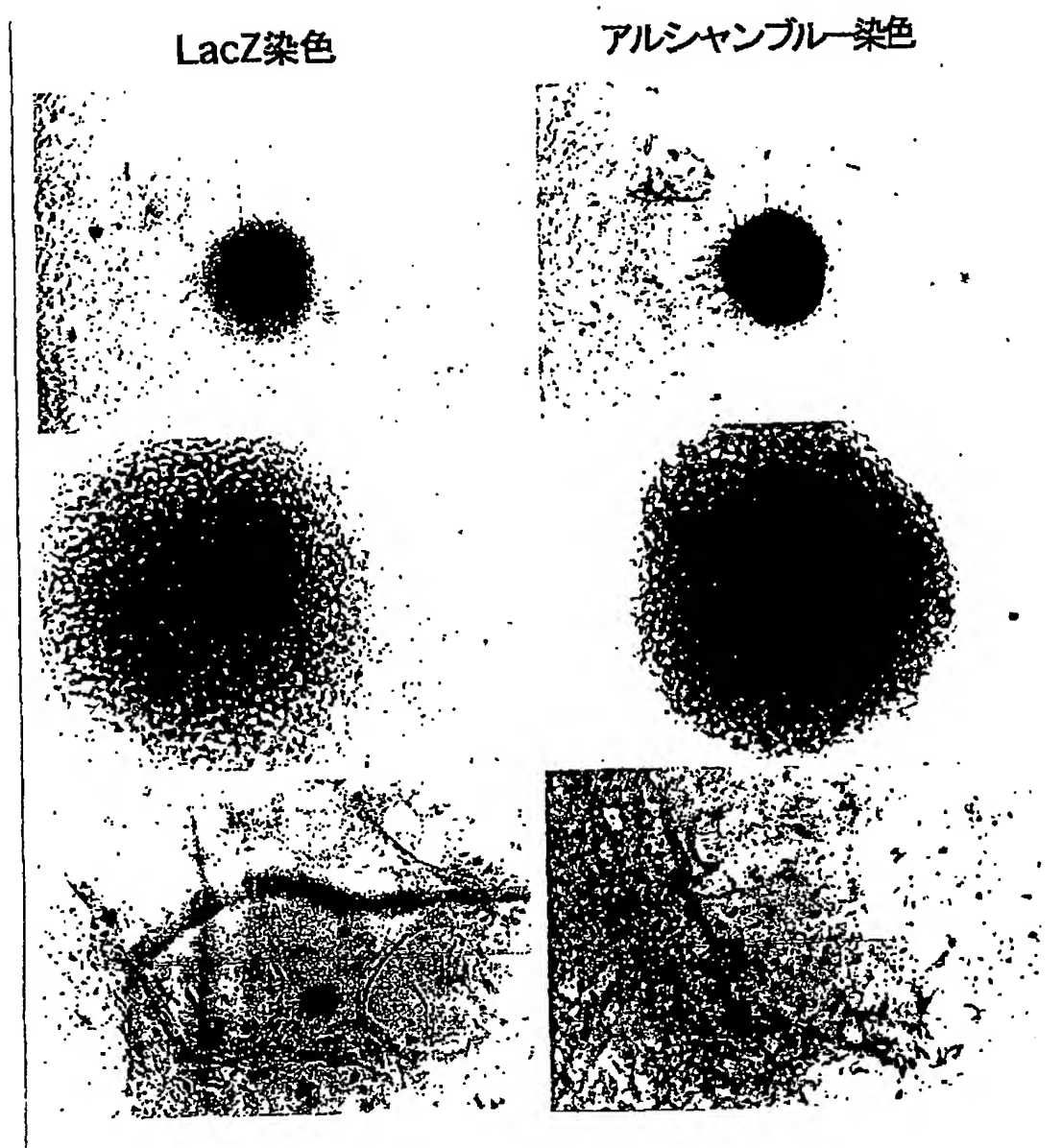
33





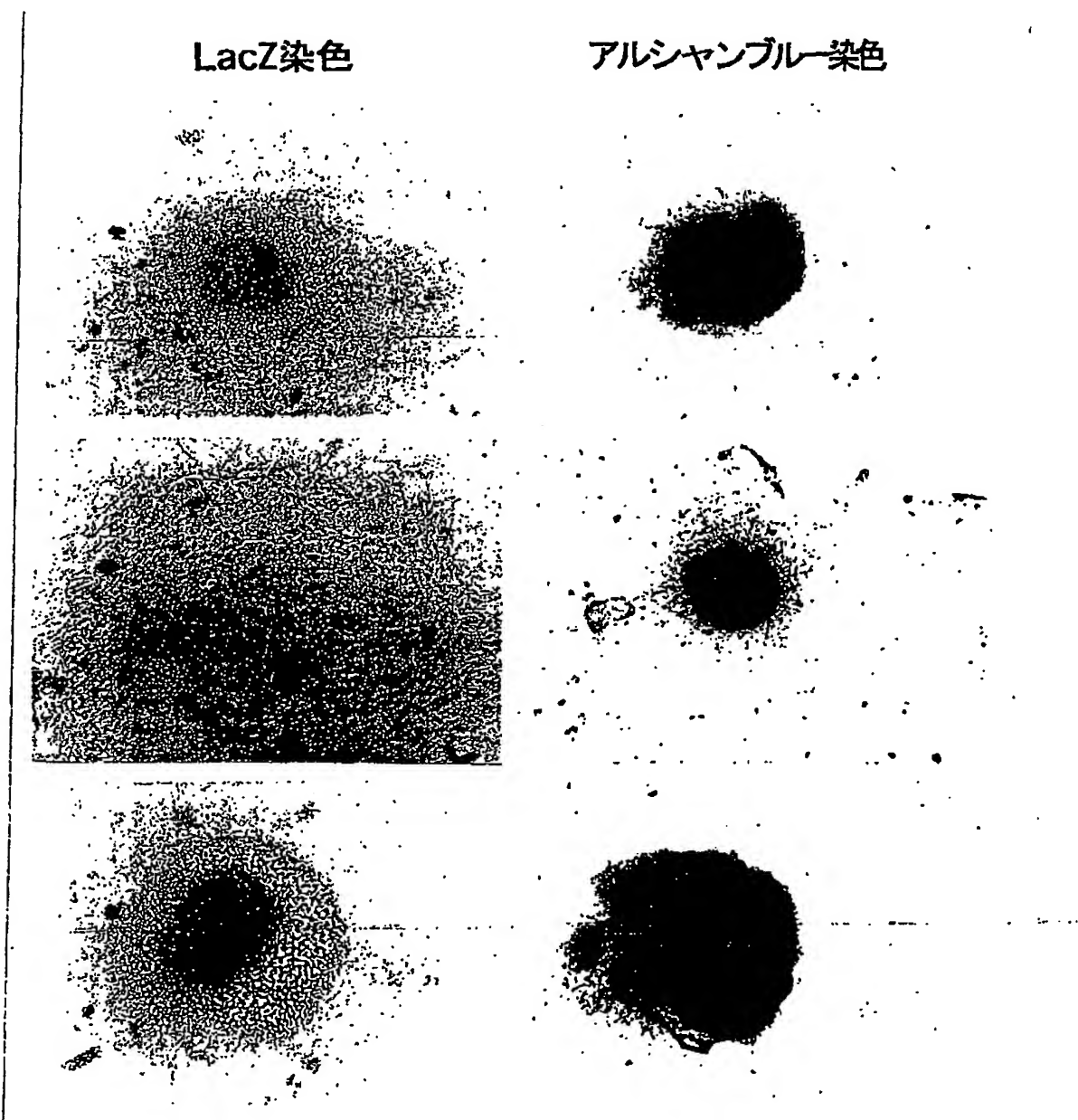
34/46

図34



35 / 46

図 35



36 / 46

図 36



37 / 46

図 37

ホモ (Homo)      ヘテロ (Hetero) x63      ヘテロ (Hetero) x63      野生型 (WT) x63

x63

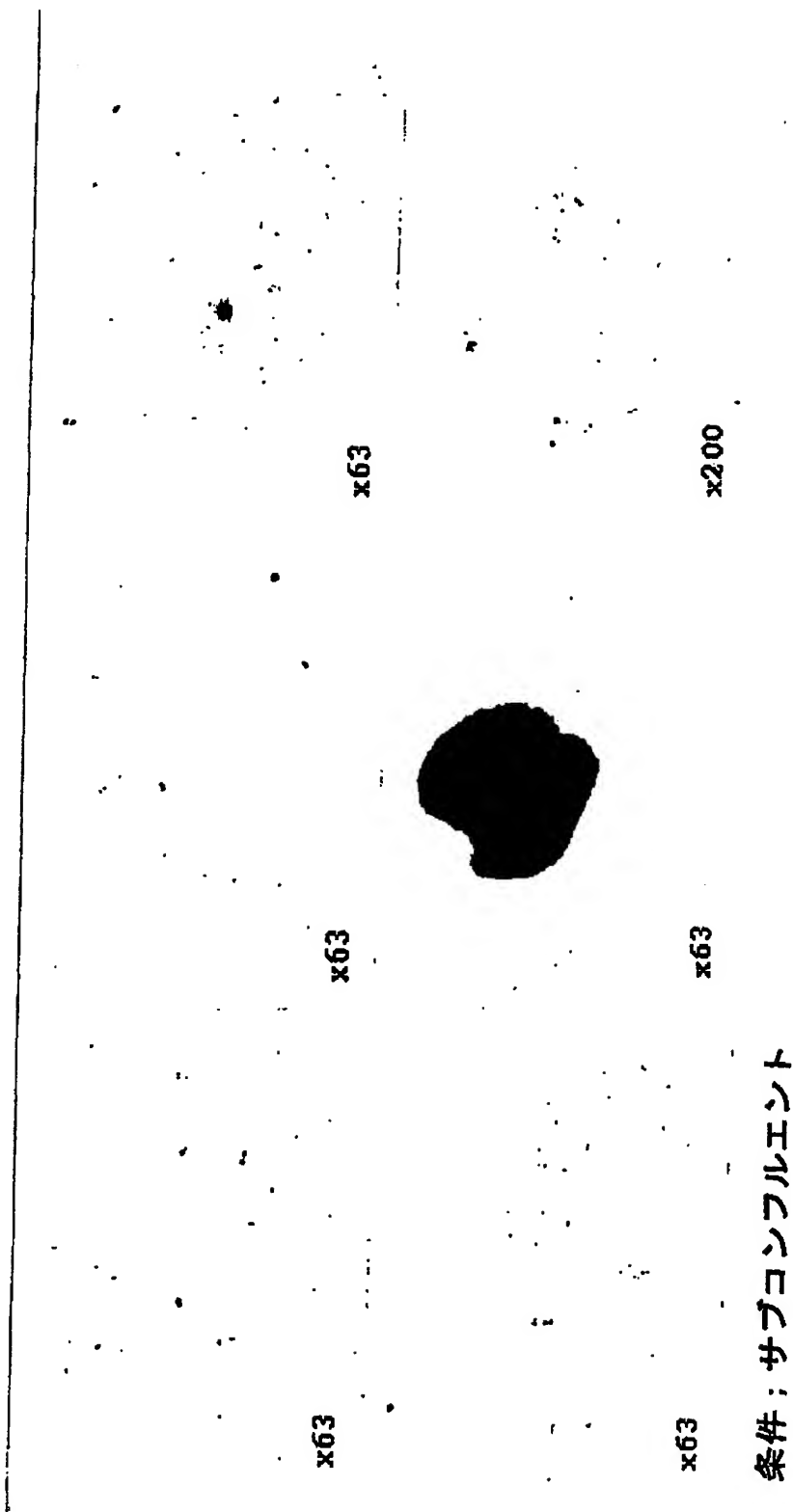
x200

x200



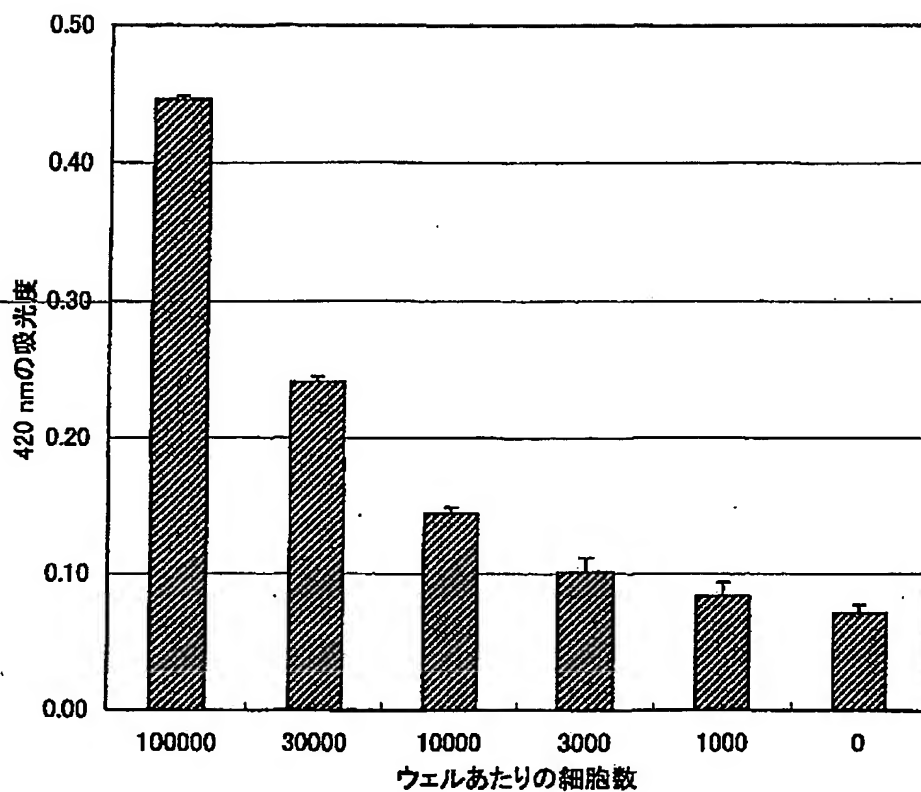
38 / 46

図 38



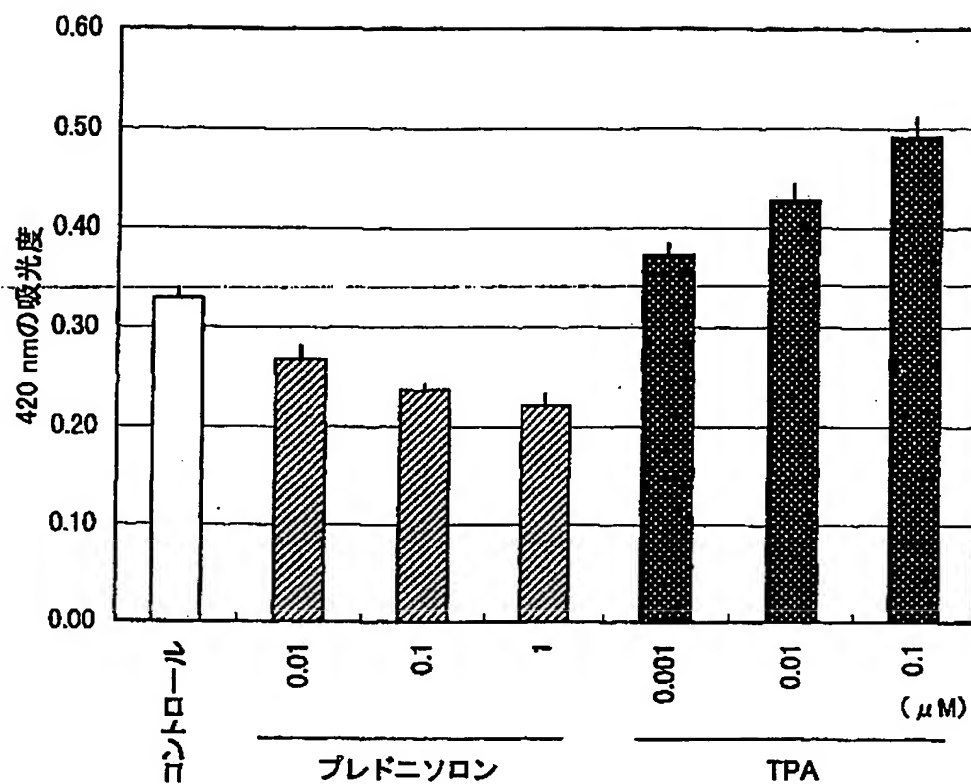
39 / 46

図 3 9



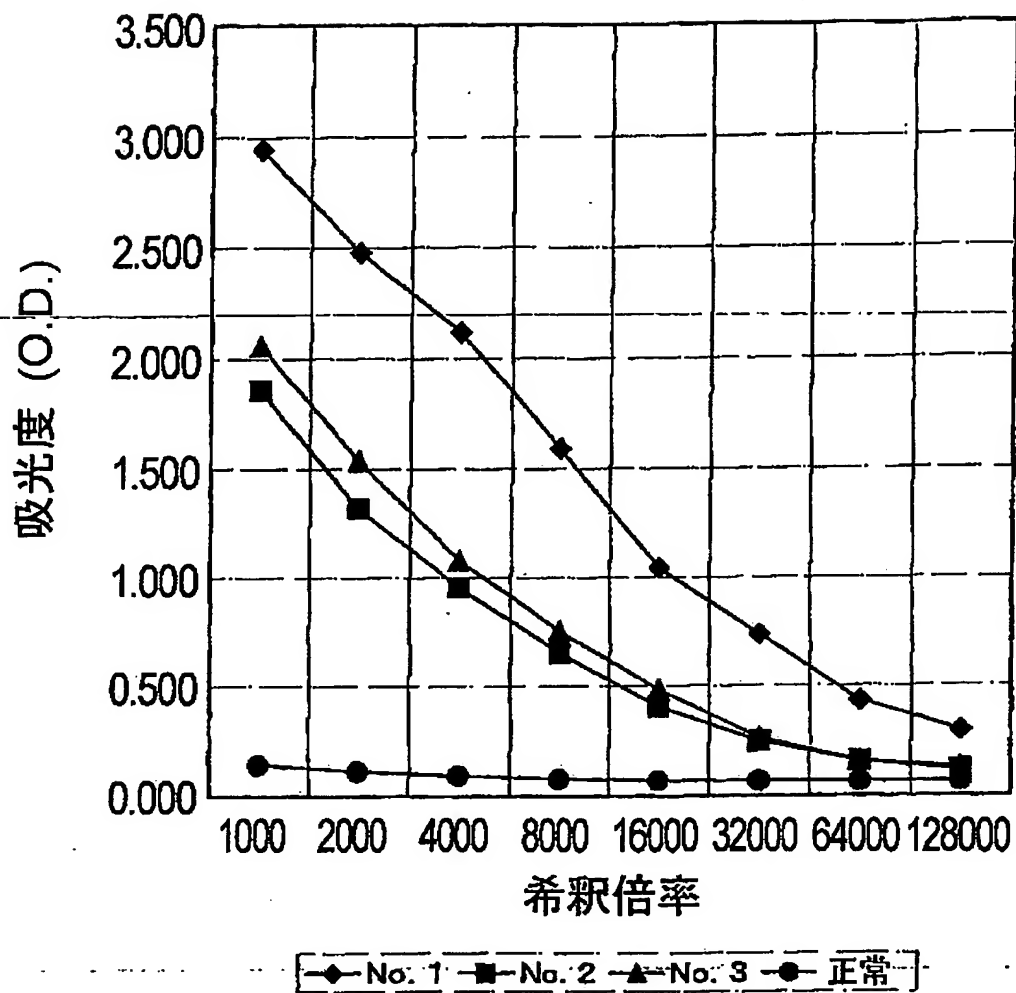
40/46

図 40



41/46

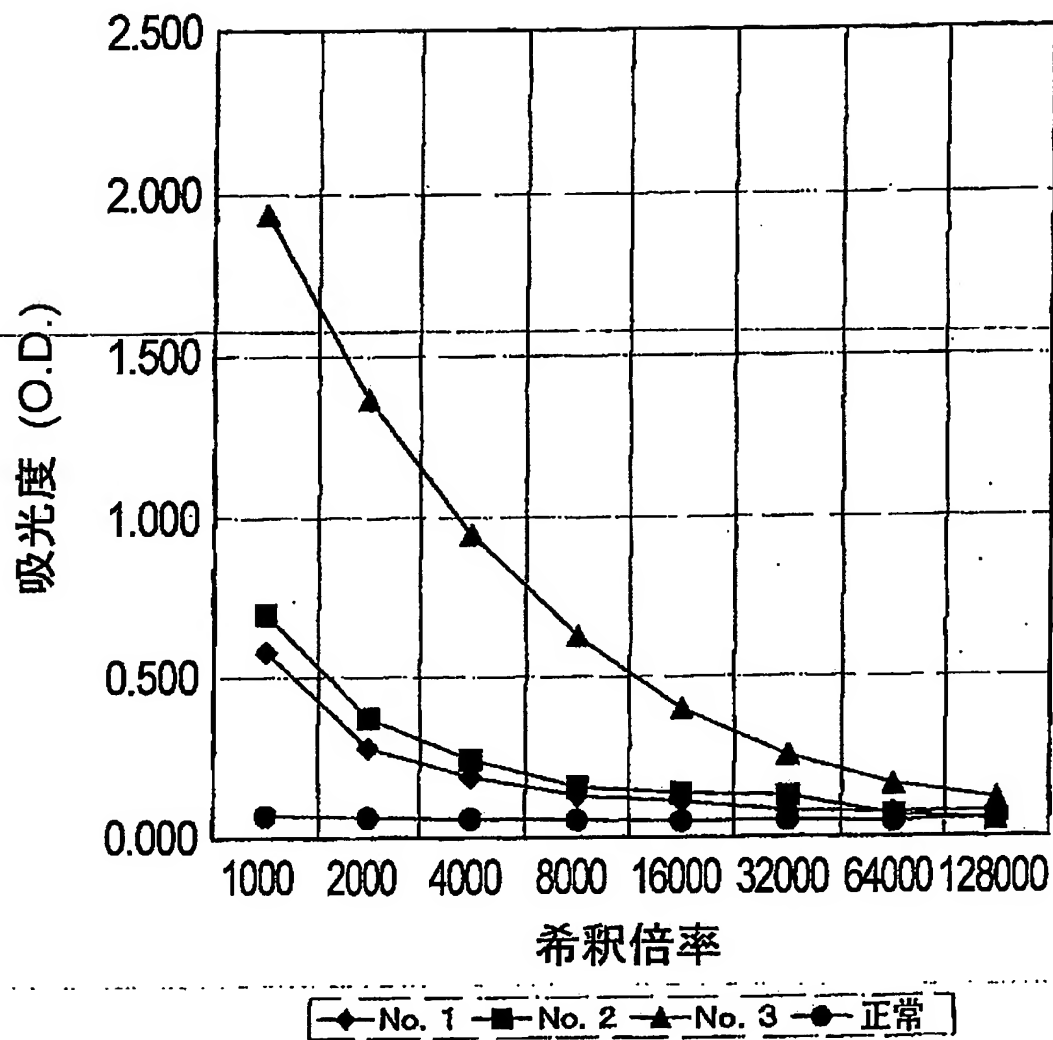
図 4 1





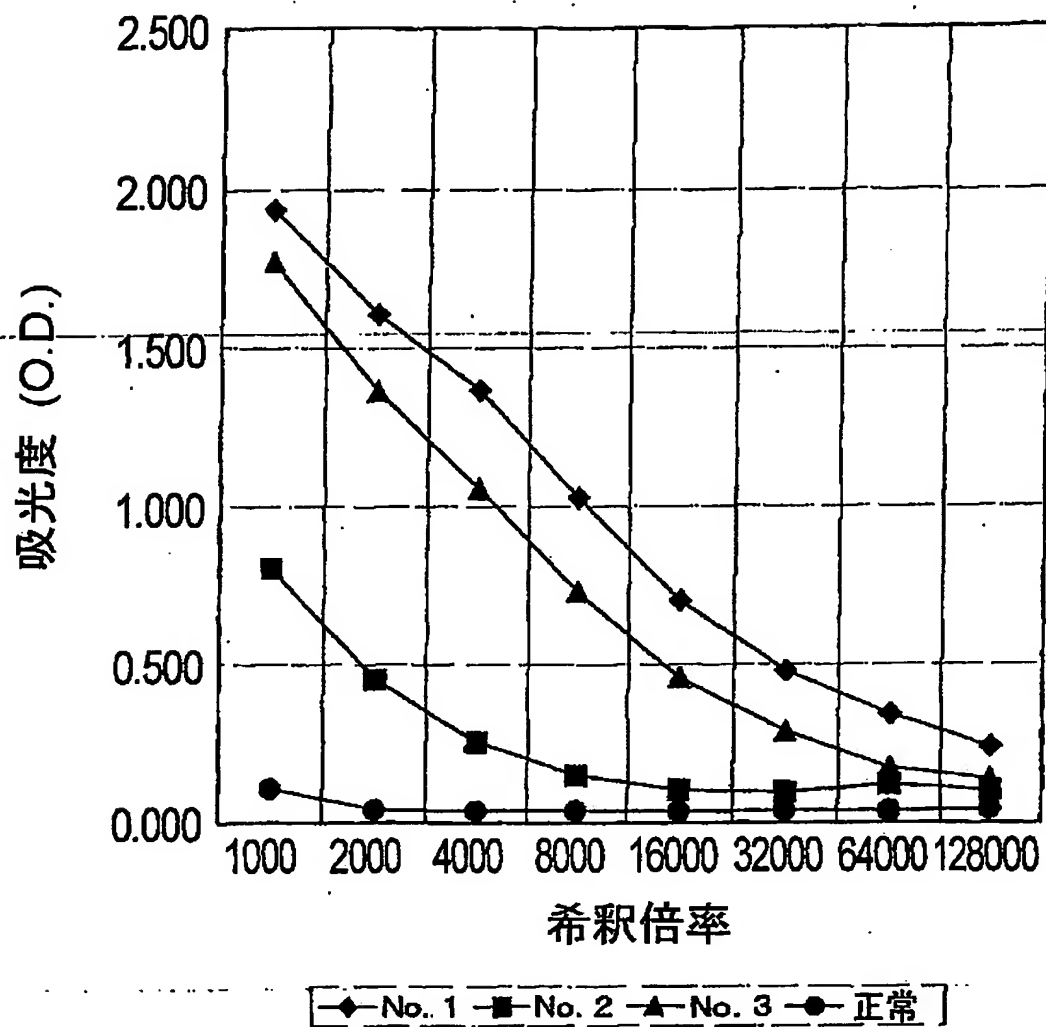
42/46

図 4 2



43/46

図43

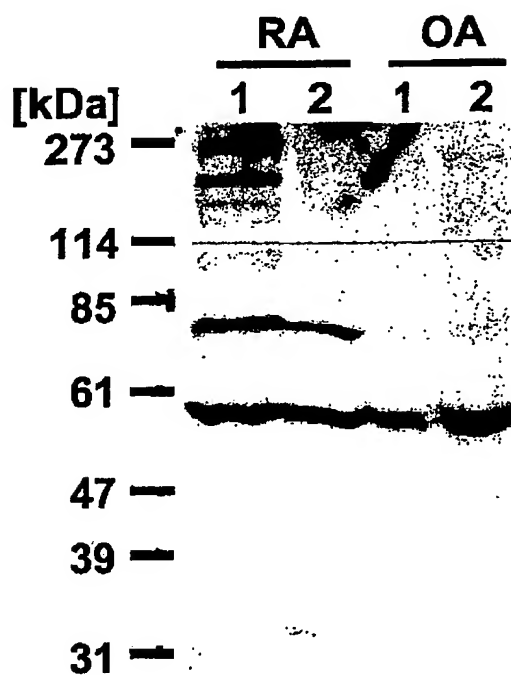


44/46

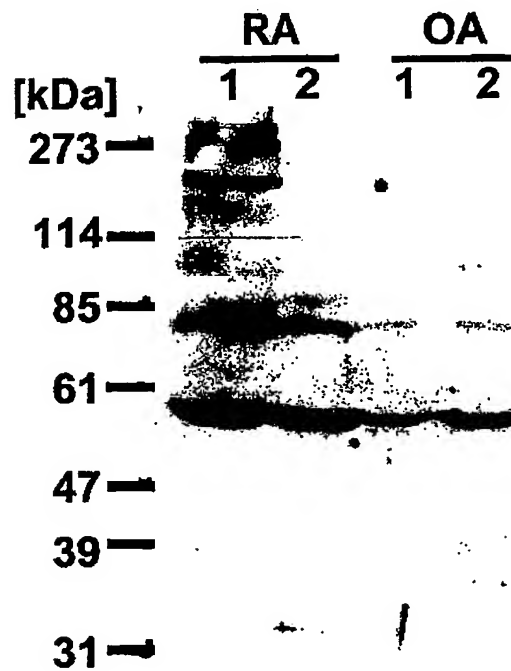
☒ 44

(A)

Mab 10Db



Mab 7Bc

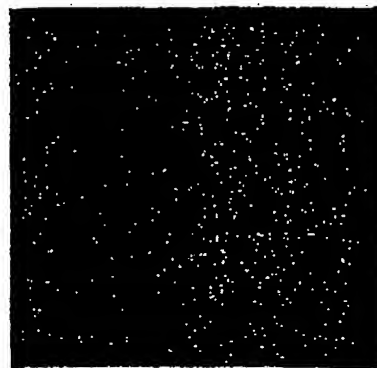


(B)

Mab 10Db



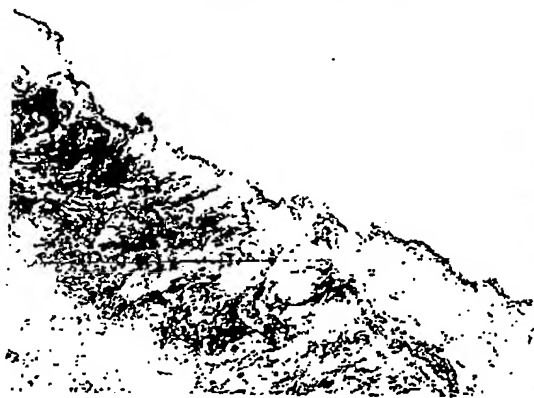
对照



45 / 46

図 45

**Mab 10Db**



**Mab 7Bc**

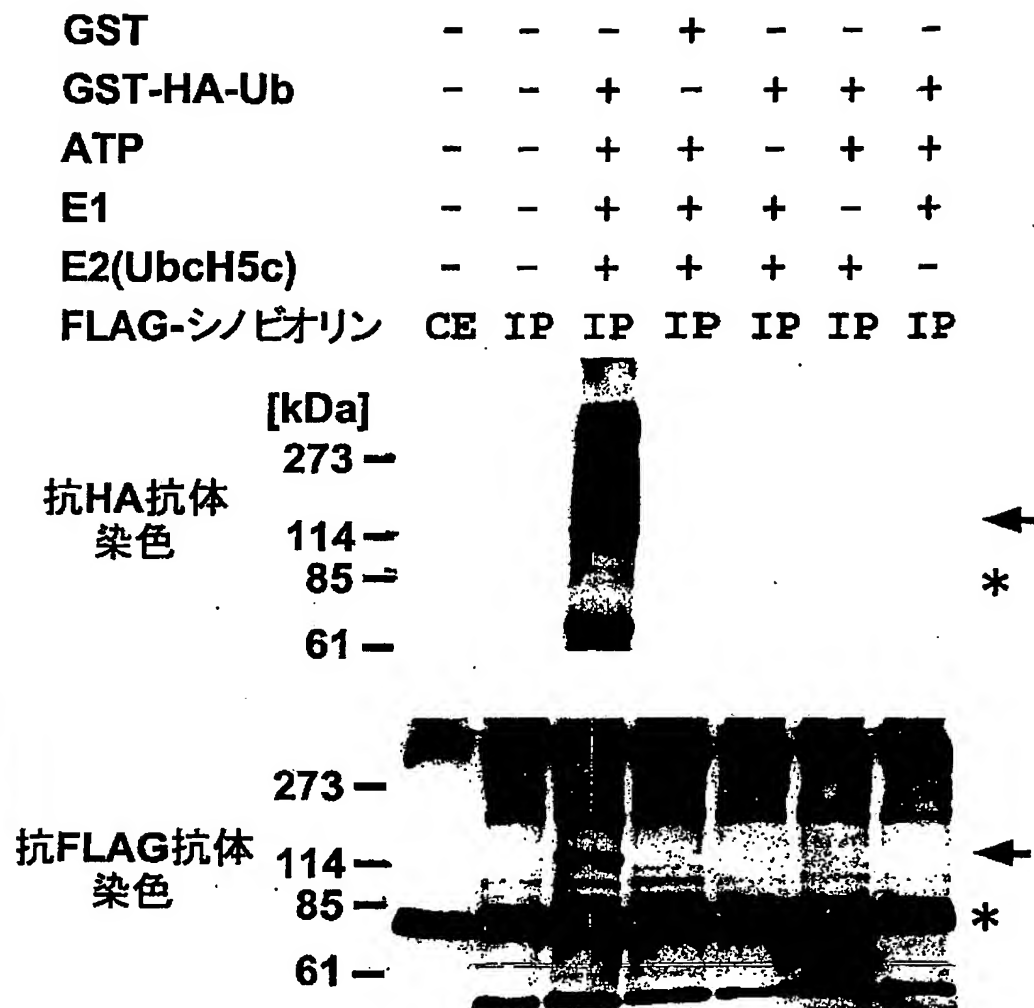


**HE染色**



46 / 46

図 4 6



1/29

SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.

<120> synovial cell protein

<130> BHP-A0001Y1P

<140>

<141>

<150> JP 2000-405082

<151> 2000-12-22

<150> JP 2001-266492

<151> 2001-06-27

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

2/29

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (403)..(2256)

&lt;400&gt; 1

gccctttctt atgagcatgc ctgtgttggg ttgacagtga gggtaataat gacttggttg 60

ttgattgtag atatagggtc ctcccttgca aggttaattag gctccttaaa ttacctgtaa 120

gattttcttg ccacagcatc cattctggtt aggtctgtga tcttctgagt agtgatagat 180

tggttggtgg tgaggtttac aggtgttccc ttctcttact cctgggtgtg gctacaatca 240

ggtggcgtct agagcagcat gggacaggtg ggtaagggga gtcttctcat tatgcagaag 300

tgatcaactt aaatctctgt cagatctacc tttatgtagc ccggcagtcg cgcggttgta 360

cggggctcgc ggcgctgggt tcctgtctc cgggccaggg ca atg ttc cgc acg 414

Met Phe Arg Thr

1

gca gtg atg atg gcg gcc agc ctg gcg ctg acc ggg gct gtg gtg gct 462

Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ala Val Val Ala

5

10

15

20

cac gcc tac tac ctc aaa cac cag ttc tac ccc act gtg gtg tac ctg 510

3/29

His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr Val Val Tyr Leu

25

30

35

acc aag tcc agc ccc agc atg gca gtc ctg tac atc cag gcc ttt gtc 558

Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile Gln Ala Phe Val

40

45

50

ctt gtc ttc ctt ctg ggc aag gtg atg ggc aag gtg ttc ttt ggg caa 606

Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val Phe Phe Gly Gln

55

60

65

ctg agg gca gca gag atg gag cac ctt ctg gaa cgt tcc tgg tac gcc 654

Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg Ser Trp Tyr Ala

70

75

80

gtc aca gag act tgt ctg gcc ttc acc gtt ttt cgg gat gac ttc agc 702

Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg Asp Asp Phe Ser

85

90

95

100

ccc cgc ttt gtt gca ctc ttc act ctt ctt ctc ttc ctc aaa tgt ttc 750

Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe Leu Lys Cys Phe

105

110

115

cac tgg ctg gct gag gac cgt gtg gac ttt atg gaa cgc agc ccc aac 798

His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu Arg Ser Pro Asn

120

125

130



4/29

atc tcc tgg ctc ttt cac tgc cgc att gtc tct ctt atg ttc ctc ctg 846  
 Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu Met Phe Leu Leu  
 135 140 145

ggc atc ctg gac ttc ctc ttc gtc agc cac gcc tat cac agc atc ctg 894  
 Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr His Ser Ile Leu  
 150 155 160

acc cgt ggg gcc tct gtg cag ctg gtg ttt ggc ttt gag tat gcc atc 942  
 Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe Glu Tyr Ala Ile  
 165 170 175 180

ctg atg acg atg gtg ctc acc atc ttc atc aag tat gtg ctg cac tcc 990  
 Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr Val Leu His Ser  
 185 190 195

gtg gac ctc cag agt gag aac ccc tgg gac aac aag gct gtg tac atg 1038  
 Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys Ala Val Tyr Met  
 200 205 210

ctc tac aca gag ctg ttt aca ggc ttc atc aag gtt ctg ctg tac atg 1086  
 Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val Leu Leu Tyr Met  
 215 220 225

gcc ttc atg acc atc atg atc aag gtg cac acc ttc cca ctc ttt gcc 1134

5/29

Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe Pro Leu Phe Ala	
230	235 240
atc cgg ccc atg tac ctg gcc atg aga cag ttc aag aaa gct gtg aca	1182
Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys Lys Ala Val Thr	
245	250 255 260
gat gcc atc atg tct cgc cga gcc atc cgc aac atg aac acc ctg tat	1230
Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met Asn Thr Leu Tyr	
	265 270 275
cca gat gcc acc cca gag gag ctc cag gca atg gac aat gtc tgc atc	1278
Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp Asn Val Cys Ile	
	280 285 290
atc tgc cga gaa gag atg gtg act ggt gcc aag aga ctg ccc tgc aac	1326
Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg Leu Pro Cys Asn	
295	300 305
cac att ttc cat acc agc tgc ctg cgc tcc tgg ttc cag cgg cag cag	1374
His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe Gln Arg Gln Gln	
310	315 320
acc tgc ccc acc tgc cgt atg gat gtc ctt cgt gca tcg ctg cca gcg	1422
Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu Pro Ala	
325	330 335 340

6/29

cag tca cca cca ccc ccg gag cct gcg gat cag ggg cca ccc cct gcc 1470

Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly Pro Pro Pro Ala

345

350

355

ccc cac ccc cca cca etc ttg cct cag ccc ccc aac ttc ccc cag ggc 1518

~~Pro-His Pro-Pro Pro-Leu-Leu-Pro Gln-Pro-Pro-Asn-Phe-Pro-Gln-Gly~~ .....

360

365

370

etc ctg cct cct ttt cct cca ggc atg ttc cca ctg tgg ccc ccc atg 1566

Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu Trp Pro Pro Met

375

380

385

ggc ccc ttt cca cct gtc ccg cct ccc ccc agc tca gga gag gct gtg 1614

Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Gly Glu Ala Val

390

395

400

~~gct cct cca tcc acc agt gca gca gcc ctt tct cgg ccc agt gga gca~~ 1662 .....

Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Ser Gly Ala

405

410

415

420

gct aca acc aca gct gct ggc acc agt gct act gct gct tct gcc aca 1710

Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ala Thr

425

430

435

gca tct ggc cca ggc tct ggc tct gcc cca gag gct ggc cct gcc cct 1758

7/29

Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly Pro Ala Pro

440

445

450

ggt ttc ccc ttc cct cct ccc tgg atg ggt atg ccc ctg cct cca ccc 1806

Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu Pro Pro Pro

455

460

465

ttt gcc ttc ccc cca atg cct gtg ccc cct gcg ggc ttt gct ggg ctg 1854

Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe Ala Gly Leu

470

475

480

acc cca gag gag cta cga gct ctg gag ggc cat gag cgg cag cac ctg 1902

Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg Gln His Leu

485

490

495

500

gag gcc cgg ctg cag agc ctg cgt aac atc cac aca ctg ctg gac gcc 1950

Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu Leu Asp Ala

505

510

515

gcc atg ctg cag atc aac cag tac ctc acc gtg ctg gcc tcc ttg ggg 1998

Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala Ser Leu Gly

520

525

530

ccc ccc cgg cct gcc act tca gtc aac tcc act gag ggg act gcc act 2046

Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly Thr Ala Thr

535

540

545

8/29

aca gtt gtt gct gct gcc tcc tcc acc agc atc cct agc tca gag gcc 2094  
 Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser Ser Glu Ala  
 550 555 560

acg acc cca acc cca gga gcc tcc cca cca gcc cct gaa atg gaa agg 2142  
 Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu Met Glu Arg  
 565 570 575 580

cct cca gct cct gag tca gtg ggc aca gag gag atg cct gag gat gga 2190  
 Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro Glu Asp Gly  
 585 590 595

gag ccc gat gca gca gag ctc cgc cgg cgc cgc ctg cag aag ctg gag 2238  
 Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln Lys Leu Glu  
 600 605 610

tct cct gtt gcc cac tga cactgcccc gcccagcccc agcctctgct 2286  
 Ser Pro Val Ala His  
 615

cttttgagca gccctcgctg gaacatgtcc tgccaccaag tgccagctcc ctctctgtct 2346

gcaccaggga gtagtaccac cagctctgag aaagaggcgg catcccctag gccaaagtga 2406

aagaggctgg gggtccatt tgactccagt ccagggcagc catggggatc tcgggtcagt 2466

tccagccttc ctctccaact cttcagccct gtgtttctgt ggggccatga aggcagaagg 2526

tttagcctct gagaagccct cttcttcccc caccctttc caggagaagg ggctgccct 2586

ccaagcccta cttgtatgtg cggagtcaca ctgcagtgcc gaacagtatt agtcccggt 2646

ccaagtgtg gactccagag gggctggagg caagctatga acttgctcgc tggcccacc 2706

ctaagactgg taccatttc cttttcttac cctgatctcc ccagaagcct cttgtggtg 2766

tggctgtgcc ccctatgcc tgtggcattt ctgcgtctta ctggcaacca cacaactcag 2826

ggaaaggaat gcctgggagt gggggtgcag gcgggcagca ctgagggacc ctgccccgc 2886

cctccccca ggcccccttc ccctgcagct tctcaagtga gactgacctg tctcaccag 2946

cagccactgc ccagccgcac tccaggcaag ggccagtgcg cctgctcctg accactgcaa 3006

tcccagcgcc caaggaaggc cacttctcaa ctggcagaac ttctgaagtt tagaattgga 3066

attacttct tactagtgtc ttttgctta aattttgtct ttggaagtg aatgcttaat 3126

cccggaag aggaacagga gtgccagact cctggtcttt ccagtttaga aaaggctctg 3186

tgccaaggag ggaccacagg agctgggacc tgctgcccc tgctcttcc ccttggtttt 3246

10/29

gtgttacaag agttgttgga gacagtttca gatgattatt taatttgtaa atattgtaca 3306

aattttaata gcttaaattg tatatacagc caaataaaaa ctgcatataa caaaaaaaaa 3366

aaaaaaaa

3374

<210> 2

<211> 617

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly

1

5

10

15

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr

20

25

30

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile

35

40

45

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val

50

55

60

11/29

Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg

65 70 75 80

Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg

85 90 95

Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe

100 105 110

Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu

115 120 125

Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu

130 135 140

Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr

145 150 155 160

His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe

165 170 175

Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr

180 185 190

Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys

195 200 205



12/29

Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val  
210 215 220

Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe  
225 230 235 240

Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys  
245 250 255

Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met  
260 265 270

Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp  
275 280 285

Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg  
290 295 300

Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe  
305 310 315 320

Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala  
325 330 335

Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly

13/29

340	345	350
Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn		
355	360	365
Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu		
370	375	380
Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser		
385	390	395 400
Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg		
405	410	415
Pro Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala		
420	425	430
Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala		
435	440	445
Gly Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro		
450	455	460
Leu Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly		
465	470	475 480

14/29

Phe Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu

485

490

495

Arg Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr

500

505

510

Leu Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu

515

520

525

Ala Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu

530

535

540

Gly Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro

545

550

555

560

Ser Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro

565

570

575

Glu Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met

580

585

590

Pro Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu

595

600

605

Gln Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His

610

615

15/29

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 3

Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Cys

1

5

10

15

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 4

16/29

Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu Pro Ala Gln Ser

1

5

10

15

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

&lt;400&gt; 5

Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Cys

1

5

10

15

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 3028

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (60)..(1910)

17/29

&lt;400&gt; 6

gcagtcgcgc ggattgagcg ggctcgcggc gctgggttcc tggctctccgg gccagggca 59

atg ttc cgc acg gca gtg atg atg gcg gcc agc ctg gcg ctg acc ggg 107

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly

1 5 10 15

gct gtg gtg gct cac gcc tac tac ctc aaa cac cag ttc tac ccc act 155

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr

20 25 30

gtg gtg tac ctg acc aag tcc agc ccc agc atg gca gtc ctg tac atc 203

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile

35 40 45

cag gcc ttt gtc ctt gtc ttc ctt ctg ggc aag gtg atg ggc aag gtg 251

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val

50 55 60

ttc ttt ggg caa ctg agg gca gca gag atg gag cac ctt ctg gaa cgt 299

Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg

65 70 75 80

tcc tgg tac gcc gtc aca gag act tgt ctg gcc ttc acc gtt ttt cgg 347

Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg

18/29

85	90	95	
gat gac ttc agc ccc cgc ttt gtt gca ctc ttc act ctt ctt ctc ttc			395
Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe			
100	105	110	
ctc aaa tgt ttc cac tgg ctg gct gag gac cgt gtg gac ttt atg gaa			443
Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu			
115	120	125	
cgc agc ccc aac atc tcc tgg ctc ttt cac tgc cgc att gtc tct ctt			491
Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu			
130	135	140	
atg ttc ctc ctg ggc atc ctg gac ttc ctc ttc gtc agc cac gcc tat			539
Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr			
145	150	155	160
cac agc atc ctg acc cgt ggg gcc tct gtg cag ctg gtg ttt ggc ttt			587
His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe			
165	170	175	
gag tat gcc atc ctg atg acg atg gtg ctc acc atc ttc atc aag tat			635
Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr			
180	185	190	

19/29

gtg ctg cac tcc gtg gac ctc cag agt gag aac ccc tgg gac aac aag 683  
 Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys  
 195 200 205

gct gtg tac atg ctc tac aca gag ctg ttt aca ggc ttc atc aag gtt 731  
 Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val  
 210 215 220

ctg ctg tac atg gcc ttc atg acc atc atg atc aag gtg cac acc ttc 779  
 Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe  
 225 230 235 240

cca ctc ttt gcc atc cgg ccc atg tac ctg gcc atg aga cag ttc aag 827  
 Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys  
 245 250 255

aaa gct gtg aca gat gcc atc atg tct cgc cga gcc atc cgc aac atg 875  
 Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met  
 260 265 270

aac acc ctg tat cca gat gcc acc cca gag gag ctc cag gca atg gac 923  
 Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp  
 275 280 285

aat gtc tgc atc atc tgc cga gaa gag atg gtg act ggt gcc aag aga 971  
 Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg



20/29

290	295	300	
ctg ccc tgc aac cac att ttc cat acc agc tgc ctg cgc tcc tgg ttc			1019
Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe			
305	310	315	320
cag cgg cag cag acc tgc ccc acc tgc cgt atg gat gtc ctt cgt gca			1067
Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala			
	325	330	335
tcg ctg cca gcg cag tca cca cca ccc ccg gag cct gcg gat cag ggg			1115
Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly			
340	345	350	
cca ccc cct gcc ccc cac ccc cca cca ctc ttg cct cag ccc ccc aac			1163
Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn			
355	360	365	
ttc ccc cag ggc ctc ctg cct cct ttt cct cca ggc atg ttc cca ctg			1211
Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu			
370	375	380	
tgg ccc ccc atg ggc ccc ttt cca cct gtc ccg cct ccc ccc agc tca			1259
Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser			
385	390	395	400

21/29

gga gag gct gtg gct cct cca tcc acc agt gca gcc ctt tct cgg ccc 1307

Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Leu Ser Arg Pro

405

410

415

agt gga gca gct aca acc aca gct gct ggc acc agt gct act gct gct 1355

Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala

420

425

430

tct gcc aca gca tct ggc cca ggc tct ggc tct gcc cca gag gct ggc 1403

Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly

435

440

445

cct gcc cct ggt ttc ccc ttc cct cct ccc tgg atg ggt atg ccc ctg 1451

Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu

450

455

460

cct cca ccc ttt gcc ttc ccc cca atg cct gtg ccc cct gcg ggc ttt 1499

Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe

465

470

475

480

gct ggg ctg acc cca gag gag cta cga gct ctg gag ggc cat gag cgg 1547

Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg

485

490

495

cag cac ctg gag gcc cgg ctg cag agc ctg cgt aac atc cac aca ctg 1595

Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu

22/29

500	505	510	
ctg gac gcc gcc atg ctg cag atc aac cag tac ctc acc gtg ctg gcc			1643
Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala			
515	520	525	
tcc ttg ggg ccc ccc cgg cct gcc act tca gtc aac tcc act gag ggg			1691
Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly			
530	535	540	
act gcc act aca gtt gtt gct gct gcc tcc tcc acc agc atc cct agc			1739
Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser			
545	550	555	560
tca gag gcc acg acc cca acc cca gga gcc tcc cca cca gcc cct gaa			1787
Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu			
565	570	575	
atg gaa agg cct cca gct cct gag tca gtg ggc aca gag gag atg cct			1835
Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro			
580	585	590	
gag gat gga gag ccc gat gca gca gag ctc cgc cgg cgc cgc ctg cag			1883
Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln			
595	600	605	

23/29

aag ctg gag tct cct gtt gcc cac tga cactgcccc gcccagcccc 1930

Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His

610

615

agcctctgct cttttgagca gccctcgctg gaacatgtcc tgccaccaag tgccagctcc 1990

ctctctgtct gcaccaggga gtagtacccc cagctctgag aaagaggcgg catcccctag 2050

gccaaagtga aagaggctgg ggttccatt tgactccagt cccaggcagc catggggatc 2110

tgggtcagt tccagccttc ctctccaact cttcagccct gtgttctgct ggggccatga 2170

aggcagaagg tttagcctct gagaagccct cttcttcccc caccctttc caggagaagg 2230

ggctgcccct ccaagcccta cttgtatgtg cggagtcaca ctgcagtgcc gaacagtatt 2290

agctcccggt cccaagtgtg gactccagag gggctggagg caagctatga acttgctgcg 2350

tgcccccccc ctaagactgg tacccatttc cttttcttac cctgatctcc ccagaagcct 2410

cttgtggtgg tggtgtgcc ccctatgccc tgtggcattt ctgcgtctta ctggcaacca 2470

cacaactcag ggaaaggaat gcctgggagt ggggtgcag gcgggcagca ctgagggacc 2530

ctgccccgcc cctcccccca ggcccccttc ccctgcagct tctcaagtga gactgacctg 2590

24/29

tctcaccag cagccactgc ccagccgcac tccaggcaag ggccagtgcg cctgctcctg 2650  
accactgcaa tcccagcgcc caaggaaggc cacttctcaa ctggcagaac ttctgaagtt 2710  
tagaattgga attacttcct tactagtgtc ttttggtta aattttgtct ttgaagttg 2770  
aatgcttaat cccgggaaag aggaacagga gtgccagact cctggtcttt ccagtttaga 2830  
aaaggctctg tgccaaggag ggaccacagg agctgggacc tgctgcccc tgccttttcc 2890  
ccttggtttt gtgttacaag agttgttgga gacagtttca gatgattatt taatttgtaa 2950  
atattgtaca aattttaata gcttaaattg tatatacagc caaataaaaa cttgcattaa 3010  
caaaaaaaaa aaaaaaaaa 3028

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 616

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly

1

5

10

15

25/29

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr

20

25

30

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile

35

40

45

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val

50

55

60

Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg

65

70

75

80

Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg

85

90

95

Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe

100

105

110

Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu

115

120

125

Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu

130

135

140

Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr

145

150

155

160

26/29

His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe  
165 170 175

Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr  
180 185 190

Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys  
195 200 205

Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val  
210 215 220

Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe  
225 230 235 240

Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys  
245 250 255

Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met  
260 265 270

Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp  
275 280 285

Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg

27/29

290	295	300	
Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe			
305	310	315	320
Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala			
	325	330	335
Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly			
	340	345	350
Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn			
	355	360	365
Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu			
	370	375	380
Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser			
385	390	395	400
Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Leu Ser Arg Pro			
	405	410	415
Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala			
	420	425	430



28/29

Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly  
435 440 445

Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu  
450 455 460

Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe  
465 470 475 480

Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg  
485 490 495

Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu  
500 505 510

Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala  
515 520 525

Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly  
530 535 540

Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser  
545 550 555 560

Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu  
565 570 575

29/29

Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro  
580 585 590

Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln  
595 600 605

Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His  
610 615

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11289

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19, C07K14/47,  
C07K16/18, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19, C07K14/47,  
C07K16/18, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST FILE (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 98/45437 A (Genetics Institute, Inc.), 15 October, 1998 (15.10.1998), & EP 973899 A2 & JP 2001-518793 A	2, 3 1, 4-7
A	Minako NAKAZAWA et al., "Katsu-maku Saibou Kassei-ka ni okeru CBP no Yakuwari", Rinshou Men-eki, March, 2000, Vol.33, No.2, pages 261 to 264	1-48
A	Beata LECKA-CZERNIK et al., "An Overexpressed Gene Transcript in Senescent and Quiescent Human Fibroblasts Encoding a Novel Protein in the Epidermal Growth Factor-Like Repeat Family Stimulates DNA Synthesis", Molecular and Cellular Biology, January, 1995, Vol.15, No.1, pages 120 to 128	29
A	Elise HCON et al., "Linkage of Autosomal Dominant Radial Drusen (Malattia Leventinese) to Chromosome 2p16-21", Arch Ophthalmol., February, 1996, Vol.114, No.2, pages 193 to 198	29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 February, 2002 (13.02.02)

Date of mailing of the international search report  
26 February, 2002 (26.02.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11289

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shiro IKEGAWA et al., "Structure and Chromosomal Assignment of the Human S1-5 Gene (FBNL) That Is Homologous to Fibrillin", Genomics, May, 1996, Vol.35, No.3, pages 590 to 592	29

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19,  
C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19,  
C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq,  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 98/45437 A (GENETICS INSTITUTE, INC.) 1998.10.15 & EP 973899 A2 & JP 2001-518793 A	2, 3/ 1, 4-7
A	中澤 美奈子 他 滑膜細胞活性化におけるCBPの役割, 臨床免疫, 3月.2000, 第33巻, 第2号, 261-264頁	1-48

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.02.02

国際調査報告の発送日

26.02.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4N 9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Beata LECKA-CZERNIK et al. An Overexpressed Gene Transcript in Senescent and Quiescent Human Fibroblasts Encoding a Novel Protein in the Epidermal Growth Factor-Like Repeat Family Stimulates DNA Synthesis. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY January 1995, Vol. 15, No. 1, p. 120-128	29
A	Elise HCON et al. Linkage of Autosomal Dominant Radial Drusen (Malattia Leventinese) to Chromosome 2p16-21. ARCH OPHTHALMOL February 1996, Vol. 114, No. 2, p. 193-198	29
A	Shiro IKEGAWA et al. Structure and Chromosomal Assignment of the Human SI-5 Gene (FBNL) That Is Homologous to Fibrillin. GENOMICS May 1996, Vol. 35, No. 3, p. 590-592	29

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**